Supplemento ordinario n. 2 alla «Gazzetta Ufficiale» n. 305 del 30 dicembre 1985

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I (70%)

GAZZETTA UFFICIALE

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA **Roma - Lunedì, 30 dicembre 1985** SI PUBBLICA NEL POMERIGGIO DI TUTTI I GIORNI MENO I FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DELLA GIUSTIZIA UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA 70 - 00100 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 85081

N. 109

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO MINISTERIALE 3 dicembre 1985.

Classificazione e disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze pericolose, in attuazione delle direttive emanate dal Consiglio e dalla Commissione delle Comunità europee.

SOMMARIO

MINISTERO DELLA SANITÀ

LEGGI E DECRETI

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO MINISTERIALE 3 dicembre 1985.

Classificazione e disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze pericolose, in attuazione delle direttive emanate dal Consiglio e dalla Commissione delle Comunità europee.

IL MINISTRO DELLA SANITÀ

DI CONCERTO CON

I MINISTRI DELL'INTERNO, DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO,
DEL LAVORO E DELLA PREVIDENZA SOCIALE;

Visti gli articoli 3 e 6 della legge 29 maggio 1974, n. 256, concernente la classificazione e disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze e dei preparati pericolosi;
Visto il decreto del Presidente della Repubblica del 6 giugno 1977, n. 1147;
Visto il decreto del Presidente della Repubblica 24 novembre 1981, n. 927;
Visto il decreto ministeriale 21 maggio 1981, concernente la classificazione e disciplina dell'imballaggio e dell'etichettatura delle sostanze pericolose;
Viste le direttive della Commissione delle Comunità europee 81/957 del 23 ottobre 1981, 82/232 del 25 marzo 1982, 83/467 del 29 luglio 1983 e 84/449 del 25 aprile 1984 concernenti il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri relative alla classificazione, all'imballaggio ed all'etichettatura delle sostanze pericolose;
Considerato che l'esame di detto decreto 21 maggio 1981 ha evidenziato l'esigenza di adeguarlo al più recente stadio delle conoscenze scientifiche e tecniche, nel senso di modificarlo ed aggiornarlo in conformità alle direttive sopra indicate;

Decreta:

Art. 1.

Il presente decreto sostituisce ed integra ogni disposizione contenuta nel decreto ministeriale 21 maggio 1981.

Art. 2.

La classificazione delle sostanze, di cui all'articolo 3 della legge 29 maggio 1974, n. 256, è riportata nell'allegato I.
I simboli di pericolo e le indicazioni di pericolo, di cui all'articolo 5, punto 3), della legge sono riportati nell'allegato II.
Le frasi tipo indicanti la natura dei rischi specifici, di cui all'articolo 5, punto 4), della legge sono riportate nell'allegato III.
I consigli di prudenza, di cui all'articolo 5, punto 5), della legge, sono riportati nell'allegato IV.
Alcuni metodi sperimentali per la determinazione delle proprietà fisico-chimiche, tossicologiche ed ecotossicologiche sono riportati nell'allegato V.
Gli allegati I, II, III, IV, e V fanno parte integrante del presente decreto.

Art. 3.

Per le sostanze pericolose, che vanno ad aggiungersi a quelle già presenti nell'elenco di cui all'allegato I del decreto ministeriale 21 maggio 1981, individuate dal contrassegno (*) riportato sul margine sinistro dell'allegato I al presente decreto, il termine di cui all'ultimo comma dell'art. 6 della legge 29 maggio 1974, n. 256, concernente lo smaltimento delle sostanze già immesse sul mercato e non conformi nell'etichettatura alle disposizioni contenute nel presente decreto, è fissato in mesi dodici dalla data di pubblicazione del decreto stesso.

Art. 4.

Per le sostanze, già presenti nell'allegato I del decreto ministeriale 21 maggio 1981 e per le quali nell'allegato I del presente decreto sono prescritte rettifiche o modifiche dell'etichettatura e che sono individuate dal contrassegno (**) riportato sul margine sinistro dell'elenco stesso, il termine di cui all'ultimo comma dell'art. 6 della legge 29 maggio 1974, n. 256, concernente lo smaltimento delle sostanze già immesse sul mercato non conformi nell'etichettatura alle disposizioni contenute nel presente decreto, è fissato in mesi dodici dalla data di pubblicazione del decreto stesso.

Art. 5.

Fatto salvo quanto indicato agli articoli 3 e 4, le nuove disposizioni che vanno ad aggiungersi a quelle già presenti negli allegati II, III, IV del decreto ministeriale 21 maggio 1981, e che sono individuate negli allegati medesimi dal contrassegno (+) riportato sul margine sinistro degli allegati stessi, si applicano a partire dal 1° gennaio 1986. È inoltre concesso, dopo tale data, ai sensi dell'ultimo comma dell'art. 6 della legge 29 maggio 1974, n. 256, un ulteriore periodo di dodici mesi, per lo smaltimento delle sostanze già immesse sul mercato e non conformi nell'etichettatura alle disposizioni di cui al comma precedente.

Le nuove disposizioni che vanno ad aggiungersi a quelle già presenti nell'allegato V del decreto ministeriale 21 maggio 1984 si applicano a partire dal 1° luglio 1986.

Art. 6.

Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, addì 3 dicembre 1985

Il Ministro della sanità
DEGAN

Il Ministro dell'interno
SCALFARO

Il Ministro dell'industria
ALTISSIMO

Il Ministro del lavoro e della previdenza sociale
DE MICHELIS

ALLEGATO I

ELENCO DELLE SOSTANZE PERICOLOSE

Prefazione

Per consentire un'agevole consultazione dell'elenco delle sostanze pericolose, queste sono state sistemate in ordine alfabetico affiancando loro un numero d'ordine progressivo indicato nella prima colonna dell'allegato.

Qualora per una stessa sostanza sono riprese nell'elenco due o più denominazioni, solo in corrispondenza di una di esse sono riportate le indicazioni complete relative alla numerazione CEE, al numero CAS, alla classificazione e all'etichettatura, mentre l'altra o le altre si limitano ad un rinvio alla denominazione assunta come voce principale.

Nel caso di miscele, queste sono riportate nell'elenco sotto le singole sostanze, in modo che si possa giungere ad esse miscele a partire da qualsiasi componente.

La numerazione delle sostanze (N.CEE), riportata nella quinta colonna dell'allegato, è stata concepita per consentire aggiornamenti periodici dell'allegato I, senza apportare rilevanti modifiche alla sua presentazione. Essa è basata sull'impiego di una sequenza cifrata del tipo: ABC-RST-VW-Y in cui:

ABC rappresenta il numero atomico dell'elemento chimico più caratteristico preceduto da uno o due zeri per completare la sottosequenza, sia il numero convenzionale della classificazione prescelta per le sostanze organiche;

RST rappresenta il numero progressivo delle sostanze considerate nella sottosequenza ABC;

VW rappresenta, per la sostanza così definita, una delle forme in cui viene prodotta e/o immessa sul mercato;

Y rappresenta la cifra di controllo (check-digit) di tutta la precedente sequenza calcolata secondo il metodo utilizzato da ISBN (International Standard Book Number).

ABC-RST-VW-Y
n. 017-005-00-9

Il numero CAS (Chemical Abstract Service), riportato nella quarta colonna, permette d'identificare la sostanza. Le indicazioni che riguardano la classificazione o l'etichettatura della sostanza sono le seguenti:

a) il o i simboli ove previsti e l'indicazione di pericolo attribuiti in base all'allegato II (sesta colonna dell'allegato);

b) una serie di cifre precedute dalla R che indica la natura dei rischi particolari di cui all'allegato III (settima colonna dell'allegato);

c) una serie di cifre precedute dalla lettera S che indica i consigli di prudenza di cui all'allegato IV (ottava colonna dell'allegato).

Le cifre che seguono le lettere R e S sono separate o da un trattino orizzontale o da una barra obliqua, che hanno il seguente significato:

trattino orizzontale: enunciazione separata dei rischi particolari (R) o dei consigli di prudenza (S);

barra obliqua: enunciazione combinata possibile in una sola frase dei rischi particolari (R) o dei consigli di prudenza (S).

Le enunciazioni singole o combinate dei rischi particolari (R) figurano nell'allegato III e quelle dei consigli di prudenza (S) nell'allegato IV.

Per poter esprimere i requisiti di classificazione ed etichettatura in forma tabulare si è fatto ricorso, nel presente allegato per i simboli di pericolo, ad indicazioni sintetiche del tipo «T+» o «T» per le sostanze tossiche, «C» per le corrosive, «F+» o «F» per le infiammabili, «E» per le esplosive, «O» per le comburenti, «Xn» per le nocive, «Xi» per le irritanti, mentre per le frasi di rischio (R) ed i consigli di prudenza (S) sono stati riportati i rispettivi numeri d'ordine.

Sull'etichetta, però, dovranno figurare il simbolo o i simboli rappresentati dalle illustrazioni e seguiti dall'indicazione di pericolo così come essi figurano rispettivamente negli allegati III e IV.

Si segnala infine, che nei casi specifici costituiti dai composti del cadmio e dai composti di antimonio il consiglio di prudenza S 22 si applica solo nei casi appropriati. Inoltre, nel caso specifico del sodio e del potassio il consiglio di prudenza S 5 non è richiesto qualora venga utilizzato altro imballaggio di sicurezza.

Per snellire al massimo la formulazione delle sostanze di questo allegato sono state utilizzate diverse note di portata generale (nona colonna) di cui si riportano di seguito i testi esplicativi:

Nota A.

Il nome della sostanza deve figurare sull'etichetta sotto la denominazione, o una delle denominazioni, qualora ne sia indicata più d'una, di cui all'allegato I. Nell'allegato I, quando le sostanze di struttura analoga presentano gli stessi pericoli, è stata talvolta utilizzata la denominazione generale del tipo: «composti di...» o «sale di...». In tal caso, il fabbricante o qualsiasi persona che immette tale sostanza sul mercato è tenuta a precisare sull'etichetta il nome chimico corrispondente alla formula chimica:

Esempio:

per $BeCl_2$: cloruro di berillio.

Nota B.

Talune sostanze (caso degli acidi, delle basi..., ecc.) vengono immesse sul mercato in soluzione acquosa a concentrazioni varie e necessitano dunque di un'etichettatura diversa poichè presentano rischi diversi. Nell'allegato I, viene utilizzata una denominazione generale del tipo:

«acido nitrico...%»

In tal caso, il fabbricante o qualsiasi altra persona che introduca tale sostanza nel mercato deve indicare sulla etichetta la concentrazione della soluzione in %.

Esempio.

«acido nitrico 45%»

L'espressione di % viene sempre intesa peso/peso salvo altra espressa specificazione. L'utilizzazione di altri dati (ad esempio, peso specifico, grado Beaumé,...) o di frasi descrittive (ad esempio, concentrato, fumante, glaciale) può essere tollerata.

Nota C.

Le sostanze organiche sono immesse sul mercato sia sotto forma isomerica ben definita, sia sotto forma di miscela di più isomeri.

Pertanto, nell'allegato I viene talvolta utilizzata una denominazione generale del tipo:

«xilene»

In tal caso, il fabbricante o qualsiasi altra persona che immette tale sostanza sul mercato, deve specificare sull'etichetta che si trattsa di un isomero ben definito o di una miscela di isomeri.

Esempi:

a) xilene orto;
b) xilene (miscela di isomeri).

Nota D.

Talune sostanze che sono suscettibili di polimerizzarsi o di decomporsi spontaneamente si riscontrano generalmente sul mercato sotto forma stabilizzata. È sotto questa forma che esse sono elencate nell'allegato I.

Tuttavia tali sostanze sono a volte immesse sul mercato sotto forma non stabilizzata. In questo caso, il fabbricante o qualsiasi altra persona che immette tali sostanze sul mercato deve specificare sull'etichetta il nome della sostanza seguito dalla dicitura: «non stabilizzata».

Esempio:

Acido metacrilico (non stabilizzato).

«Per quanto riguarda in particolare i sali (indipendentemente dalla denominazione utilizzata nell'allegato I) essi sono presi in considerazione sia nella forma anidra sia nella forma idrata, a meno che non venga espressamente specificato il contraio».

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	Acetaldeide	n. 67						
	Acetale	n. 377						
2	Acetile cloruro		75-36-5	607-011-00-5	F-C	11-14-34	9-16-26	
3	Acetilene			601-015-00-0	F	5-6-12	9-16-33	
	Acetoncianidrina	n. 240						
4	Acetone		67-64-1	606-001-00-8	F	11	9-16-23-33	
5	Acetonitrile		75-05-8	608-001-3	F-T	11-23/24/25	16-27-44	
6	Acido acetico conc.compresa tra 25% e 90%			607-002-01-3	C	34	2-23-26	B
7	Acido acetico conc. sup. a 90%		64-19-7	607-002-00-6	C	10-35	2-23-26	B
8	Acido acrilico		79-10-7	607-061-00-8	C	10-34	26-36	D
9	Acido 3-amino-benzensolfonico		121-47-1	612-013-00-4	Xn	20/21/22	25-28	
10	Acido 4-amino-benzensolfonico		121-57-3	612-014-00-X	Xn	20/21/22	25-28	
11	Acido bromidrico anidro		10035-10-6	035-002-00-0	C	35-37	7/9-26-44	
12	Acido bromidrico conc. sup. a 40%			035-002-01-8	C	34-37	7/9-26	B
13	Acido bromoacetico			607-065-00-X	T	23/24/25-35	36/37/39	
14	Acido cianidrico		74-90-8	006-006-00-X	F-T	12-26/27/28	7/9-13-16-45	
15	Acido cianidrico sali, ad esclusione dei cianuri complessi come ferrocianuri e ferricianuri e ossicianuro di Hg			006-007-00-5	T	26/27/28-32	1/2-7-28-29-45	A
16	Acido cloridrico anidro		7647-01-0	017-002-00-2	C	35-37	7/9-26-44	
17	Acido cloridrico conc.compresa tra 10% e 25%			017-002-02-7	Xi	36/38	2-28	B
18	Acido cloridrico conc. sup. a 25%			017-002-01-X	C	34-37	2-26	B
	Acido 4-cloro-fenossiacetico	n. 286						
	Acido 4-(4-cloro-2-metil-fenossi)-butirrico	n. 604						
	Acido 2-(4-cloro-2-metil-fenossi)-propionico	n. 607						
	Acido clorosolfonico	n. 261						
19	Acido dicloroacetico		79-43-6	607-066-00-5	C	35	26	
	Acido (2,4-dicloro-fenossi)-acetico	n. 300						
	Acido 4-(2,4-diclorofenossi)-butirrico	n. 302						
	Acido 2-(2,4-diclorofenossi)-propionico	n. 359						
20	Acido dicloroisocianurico		2782-57-2	613-029-00-4	O-Xn	8-22-31-36/37	8-26-41	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
21	Acido dicloroisocianurico sali di sodio e di potassio			613-030-00-X	O-Xn	8-22-31-36/37	8-26-41	
	Acido (3,6-dicloro-2-metossi)-benzoico	n. 333						
22	Acido fluoborico conc. sup. a 25%		16872-11-0	009-010-00-X	C	34	26-27	B
23	Acido fluoridrico....%		7664-39-3	009-003-00-1	T-C	26/27/28-35	7/9-26-36/37-45	B
24	Acido fluoridrico anidro		32057-09-3	009-002-00-6	T-C	26/27/28-35	7/9-26-36/37-45	
25	Acido fluorosolfonico		7789-21-1	016-018-00-7	C	20-35	26	
26	Acido fluosilicico conc. sup. a 25%		16981-83-4	009-011-00-5	C	34	26-27	B
27	Acido formico conc.compresa tra 25% e 90%		64-18-6	607-001-01-8	C	34	2-23-26	B
28	Acido formico conc. sup. a 90%		64-18-6	607-001-00-0	C	35	2-23-26	B
29	Acido fosforico conc.compresa tra 10% e 25%			015-011-01-3	Xi	36	25	B
30	Acido fosforico conc. sup. a 25%		7664-38-2	015-011-00-6	C	34	26	B
31	Acido iodidrico anidro		10034-85-2	053-002-00-9	C	35-37	7/9-26-44	
32	Acido iodidrico conc. sup. a 25%			053-002-01-6	C	34	26	B
33	Acido iodoacetico		64-69-7	607-068-00-6	T	26/27/28-35	22-36/37/39-45	
34	Acido isobutirrico		79-31-2	607-063-00-9	Xn	21/22		
35	Acido maleico		110-16-7	607-095-00-3	Xi	22-36/37/38	26-28-37	
36	Acido metacrilico		79-41-4	607-088-00-5	C	34	15-26	D
	Acido metanilico	n. 9						
	Acido 2-metilpropenoico	n. 36						
37	Acido monocloroacetico		79-11-8	607-003-00-1	T	23/24/25-35	22-36/37/39	
38	Acido monofluoroacetico		144-49-0	607-081-00-7	T	28	1/2-20-22-26-45	
39	Acido 1-naftilacetico		86-87-3	607-087-00-X	Xn	22	24/25	
40	Acido nitrico conc.compresa tra 20% e 70%			007-004-01-9	C	35	2-23-26-27	B
41	Acido nitrico conc. sup. a 70%		7697-37-2	007-004-00-1	O-C	8-35	23-26-36	B
42	Acido ossalico		144-62-7	607-006-00-8	Xn	21/22	2-24/25	
43	Acido ossalico sali			607-007-00-3	Xn	21/22	2-24/25	A
44	Acido peracetico conc. sup. a 10%		79-21-0	607-094-00-8	O-C	5-22-34	3-27-36	B,D
45	Acido perclorico conc.compresa tra 10% e 50%			017-006-01-1	C	34	23-28-36	B
46	Acido perclorico conc. sup. a 50%		7601-90-3	017-006-00-4	O-C	5-8-35	23-26-36	B

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	Acido picrico sali	n. 740						
47	Acido propionico conc.compresa tra 10% e 25%		79-09-4	607-089-01-8	Xi	36/37/38	2	B
48	Acido propionico conc. sup. a 25%		79-09-4	607-089-00-0	C	34	2-23-26	B
49	Acido solfammico		5329-14-6	016-026-00-0	Xi	36/38	2-26-28	
	Acido solfanilico	n. 10						
	Acido solfidrico	n. 564						
50	Acido solfocianico		463-56-9	615-003-00-8	Xn	20/21/22-32	2-13	
51	Acido solfocianioo sali			615-004-00-3	Xn	20/21/22-32	2-13	A
52	Acido solforico conc.compresa tra 5% e 15%			016-020-01-5	Xi	36/38	2-26	B
53	Acido solforico conc. sup a 15%		7664-93-9	016-020-00-8	C	35	2-26-30	B
	Acido stifnico	n. 913						
	Acido tiocianico	n. 50						
54	Acido tioglicolico		68-11-1	607-090-00-6	T	23/24/25-34	2-25-27-28	
55	Acido p-toluensolfonico (contenente non piu del 5% di H2SO4)		104-15-4	016-030-00-2	Xi	36/37/38	26-37	
56	Acido p-toluensolfonico (contenente piu del 5% di H2SO4)		104-15-4	016-029-00-7	C	34	26-37/39	
57	Acido tricloroacetico		76-03-9	607-004-00-7	C	35	24/25-26	
	Acido (2,3,6-triclorofenil)-acetico	n. 234						
	Acido 2,4,5-tricloro-fenossi-acetico	n. 839						
	Acido 2-(2,4,5-tricloro-fenossi)-propionico	n. 529						
	Acido tricloroisocianurico	n. 889						
58	Acido trifluoroacetico conc.compresa tra 2% e 10%		76-05-1	607-091-01-9	Xi	36/37/38	23-26	B
59	Acido trifluoroacetico conc. sup a 10%		76-05-1	607-091-00-1	C	20-35	9-26-27-28	B
60	Aconitina		302-27-2	614-008-00-2	T	26/28	1-24-45	
61	Aconitina sali			614-009-00-8	T	26/28	1-24-45	A
	Acqua ossigenata conc.compresa tra 20% e 60%	n. 562						
	Acqua ossigenata conc. sup a 60%	n. 563						
62	Acrilamide		79-06-1	616-003-00-0	T	23/24/25-33	27-44	
63	Acrilati esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			607-113-00-9	Xi	36/37/38	26-28	A

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	Acrilonitrile	n. 697						
	Acroleina	n. 782						
	Alcool allilico	n. 783						
64	Alcool amilico eccetto alcool amilico terziario		30899-19-5	603-006-00-7	Xn	10-20	24/25	C
	Alcool amilico terziario	n. 633						
65	Alcool benzilico		100-51-6	603-057-00-5	Xn	20/22	26	
	Alcool terz-butilico	n. 658						
	Alcool butilico, eccetto alcool terz-butilico	n. 188						
	Alcool etilico	n. 483						
66	Alcool furfurilico		98-00-0	603-018-00-2	Xn	20/21/22		
	Alcool isopropilico e alcool propilico	n. 781						
	Alcool metilamilico	n. 654						
	Alcool metilico	n. 627						
	Alcool propilico e alcool isopropilico	n. 781						
	Alcool tetraidrofurfurilico	n. 853						
67	Aldeide acetica		75-07-0	605-003-00-6	F-Xi	12-36/37	9-16-29-33	
	Aldeide acrilica	n. 782						
	Aldeide benzoica	n. 150						
68	Aldeide butirrica		123-72-8	605-006-00-2	F	11	9-29-33	
(**) 69	Aldeide formica conc.compresa tra 5% e 30%		50-00-0	605-001-00-5	Xi	36/37-43	2-26	B
(**) 70	Aldeide formica conc. sup. a 30%		50-00-0	605-001-01-2	T	23/24/25-43	2-28-26	B,D
71	Aldeide 2-furilica		98-01-1	605-010-00-4	T	23/25	24/25-44	
	Aldeide propionica	n. 778						
72	Aldicarb		116-06-3	006-017-00-X	T	26/27/28	1-13-28-45	
73	Aldrin		309-00-2	602-048-00-3	T	23/24/25	2-13-28-45	
74	Alletrina		584-79-2	006-025-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
75	Allidochlor		93-71-0	616-004-00-6	Xn	20/21/22-36/38	2-13	
76	Allilamina		107-11-9	612-046-00-4	F-T	11-23/24/25	9-16-24/25-44	
	Allile cloruro	n. 280						
	Allile ioduro	n. 574						
	Allil-glicidil-etere	n. 77						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	3-Allil-2-metil-4-osso-ciclopent-2-en-1-ile (+/-)-2,2-dimetil-(2-metil-propen-1-il)-3-ciclopropancarbossilato	n. 74						
(**) 77	1-Allilossi-2,3-epossipropano		106-92-3	603-038-00-1	Xn	20-43	24/25	
78	Alluminio - alchili			013-004-00-2	F-C	14-17-34	16-43	A
79	Alluminio cloruro anidro			013-003-00-7	C	34	7/8-28	
80	Alluminio fosfuro		20859-73-8	015-004-00-8	F-T	15/29-28	1/2-22-43-45	
81	Alluminio isopropilato			603-042-00-3	F	11	8-16	
82	Alluminio polvere (piroforica)		7429-90-5	013-001-00-0	F	15-17	7/8-43	
83	Alluminio polvere (stabilizzata)			013-002-00-1		10-15	7/8-43	
84	Ametrin		834-12-8	613-010-00-0	Xn	20/22	2-13	
85	Amidithion		919-76-6	015-080-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
86	Amile acetato			607-130-00-2		10	23	C
	Amile cloruro	n. 676						
87	Amile formiato		638-49-3	607-018-00-3		10		C
88	Amile propionato		624-54-4	607-131-00-8		10	23	C
89	2-Aminobenzidina			612-045-00-9	Xn	20/21/22	22-36	
90	2-Aminobutano			612-052-00-7	F-Xi	11-36/37/38	13-16-29	
91	Aminocarb		2032-59-9	006-018-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
92	2-Amino-4,6-dinitrofenolo		96-91-3	612-034-00-9	E-Xn	1-20/21/22	35	
93	2-Aminoetanolo		141-43-5	603-030-00-8	Xi	20-36/37/38		
	5-Amino-3-fenil-1-bis(dimetilamino)-fosforil-1H-1,2,4,triazolo	n. 873						
94	Aminofenolo			612-033-00-3	Xn	20/21/22	28	C
(*) 95	2-Amino-2-metil-1-propanolo		124-68-5	603-070-00-6	Xi	36/37/38	26	
(*) 96	3-Aminometil-3,5,5-trimetilecicloesil amina		2855-15-2	612-067-00-9	C	21/22-34-43	26-36/37/39	
97	2-Amino-propano		75-31-0	612-007-00-1	F-Xi	12-36/37/38	16-26-29	
	3-Amino-1,2,4-1H-triazolo	n. 98						
98	Amitrolo-amitriazolo		61-82-5	613-011-00-6	Xn	20/21/22	2-13	
99	Ammoniaca anidra		7664-11-7	007-001-00-5	T	10-23	7/9-16-38	
100	Ammoniaca soluzione conc.compresa tra 10 % e 35%			007-001-02-X	Xi	36/37/38	2-26	B
101	Ammoniaca soluzione conc. sup. a 35%			007-001-01-2	C	34-36/37/38	7-26	B
(**) 102	Ammonio bicromato		7789-09-5	024-003-00-1	E-Xi	1-8-36/37/38-43	28-35	
103	Ammonio bifluoruro			009-009-00-4	C	25-34	22-26-37	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
104	Ammonio fluoruro		12125-01-8	009-006-00-8	T	23/24/25	1/2-26-44	
	Ammonio idrossido conc.compresa tra 10% e 35%	n. 100						
	Ammonio idrossido conc. sup. a 35%	n. 101						
105	Ammonio polisolfuri			016-008-00-2	C	31-34	26	
106	Anidride acetica		108-24-7	607-008-00-9	C	10-34	26	
107	Anidride 1,2,4-benzentricarbossilica		552-30-7	607-097-00-4	Xi	36/37/38-42	22-28	
108	Anidride 1,2-cicloesandicarbossilica		85-42-7	607-102-00-X	Xi	36/37/38	23-39	
	Anidride 4-cicloesen-1,2-dicarbossilica	n. 118						
	Anidride clorendica	n. 110						
	Anidride cromica	n. 290						
109	Anidride endo-cis-biciclo[2,2,1]-5-epten-2,3-dicarbossilica		129-64-6	607-105-00-6	Xi	36/37/38	39	
110	Anidride 1,4,5,6,7,7-esaclorobiciclo[2,2,1]-5-epten-2,3-dicarbossilica		115-27-5	607-101-00-4	Xi	36/37/38	25	
	Anidride esaidroftalica	n. 108						
111	Anidride fosforica		1314-56-3	015-010-00-0	C	35	22-26	
112	Anidride ftalica		85-44-9	607-009-00-4	Xi	36/37/38		
113	Anidride maleica		108-31-6	607-096-00-9	Xi	22-36/37/38-42	22-28-39	
(**) 114	Anidride 1-metil-5-norbornen-2,3-dicarbossilica		25134-21-8	607-106-00-1	Xn	22-36/37/38-42	39	C
115	Anidride propionica		123-62-6	607-010-00-X	C	34	26	
116	Anidride solforosa		7446-09-5	016-011-00-9	T	23-36/37	7/9-44	
117	Anidride succinica		108-30-5	607-103-00-5	Xi	36/37	25	
118	Anidride tetraidroftalica		85-43-8	607-099-00-5	Xi	36/37	25	
	Anidride trimellitica	n. 107						
	Anidride vanadica	n. 921						
119	Anilina		62-53-3	612-008-00-7	T	23/24/25-33	28-36/37-44	
120	Anilina sali			612-009-00-2	T	23/24/25-33	28-36/37-44	A
	o-Anisidina e p-anisidina	n. 665						
121	Antimonio composti esclusi triossido(Sb_2O_3),tetraossido(Sb_2O_4),pentaossido(Sb_2O_5),trisolfuro(Sb_2S_3),pentasolfuro(Sb_2S_5) e quelli espressamente indicati in questo allegato.			051-003-00-9	Xn	20/22	22	A
122	Antimonio pentacloruro		7647-18-9	051-002-00-3	C	34-37	26	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
123	Antimonio tricloruro		10025-91-9	051-001-00-8	C	34-37	26	
124	Antimonio trifluoruro		7783-56-4	051-004-00-4	T	23/24/25	7-26-44	
125	Antu		86-88-4	006-008-00-0	T	26/27/28-39	1-13-45	
126	Argento nitrato		7761-88-8	047-001-00-2	C	34	2-26	
127	Aria liquida			008-002-00-3	O	8-34	21	
128	Arsenico		7440-38-2	033-001-00-X	T	23/25	1/2-20/21-28-44	
129	Arsenico composti,esclusi quelli espress amente indicati in questo allegato			033-002-00-5	T	23/25	1/2-20/21-28-44	A
130	Atropina		51-55-8	614-010-00-3	T	26/28	1-25-45	
131	Atropina sali			614-011-00-9	T	26/28	1-25-45	A
(*) 132	4-Azaeptan-1,7-diamina		56-18-8	612-063-00-7	C	21/22-34-43	26-36/37/39	
(*) 133	3-Azapentan-1,5-diamina		111-40-0	612-058-00-X	C	21/22-34-43	26-36/37/39	
134	Azinphos-etile		2642-71-9	015-056-00-1	T	26/27/28	1-13-45	
135	Azinphos-metile		86-50-0	015-039-00-9	T	26/27/28-36/38	1-13-45	
	Aziridina	n. 505						
136	Azobenzene		103-33-3	611-001-00-6	Xn	20/22	28	
137	Azossibenzene		495-48-7	611-002-00-1	Xn	20/22	28	
138	Azotoato			015-082-00-3	Xn	20/22	2-13	
139	Azoto biossido		10102-44-0	007-002-00-0	T	26-37	7/9-26-45	
	Azoto tetrossido		10544-72-6					
140	Barban			006-020-00-6	Xn	20/21/22	2-13	
141	Bario clorato		13477-00-4	017-003-00-8	O-Xn	9-20/22	13-27	
142	Bario perclorato		13465-95-7	017-007-00-X	O-Xn	9-20/22	27	
143	Bario perossido		1304-29-6	056-001-00-1	O-Xn	8-20/22	13-27	
144	Bario polisolfuri			016-003-00-5	Xi	31-36/37/38	28	
145	Bario sali,escluso il solfato di bario e i sali espressamente indicati in questo allegato			056-002-00-7	Xn	20/22	28	A
146	Bario solfuro		21109-95-5	016-002-00-X	Xn	20/22-31	28	
147	Benquinox		495-73-8	650-006-00-8	T	23/24/25	2-13-44	
148	Bensulide		741-58-2	015-083-00-9	Xn	20/21/22	2-13	
149	Bentazon			613-012-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
150	Benzaldeide		100-52-7	605-012-00-5	Xn	22	24	
	Benzale cloruro	n. 357						
151	Benzene		71-43-2	601-020-00-8	F-T	11-23/24-39	9-16-29	
152	Benzidina		92-87-5	612-042-00-2	T	26/27/28-39	22-27-36-45	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
153	Benzilamina			612-047-00-X	C	34	26	
154	Benzile benzoato		120-51-4	607-085-00-9	Xn	22	25	
	Benzile bromuro	n. 180						
155	Benzile cloroformiato			607-064-00-4	C	34-37	26	
	Benzile cloruro	n. 281						
	Benzilidene cloruro	n. 357						
156	p-Benzochinone		106-51-4	606-013-00-3	T	23/25-36/37/38	26-28-44	
	p-Benzochinossima benzoilidrazone	n. 147						
157	Benzoile cloruro		98-88-4	607-012-00-0	C	34	26	
	Benzoile perossido	n. 327						
	N-(2-Benzotiazolil)-N'-metilurea	n. 161						
	Benzotricloruro	n. 890						
	Benzotrifluoruro	n. 902						
158	Benzthiazuron			006-036-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
159	Berillio		7440-41-7	004-001-00-7	T	26/27-37-39	26-28-45	
160	Berillio composti, esclusi silicati doppi di alluminio e berillio			004-002-00-2	T	26/27-37-39	26-28-45	A
	BGE	n. 206						
161	Binapacril		485-31-4	609-024-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
162	Bis-4-clorobenzoile perossido			617-011-00-7	E-Xi	3-36/37/38	3/7/9-14-27-34-37/39	
	O,O-Bis-(4-clorofenile) N-acetimidoil-fosforamidotioato	n. 738						
	1,1-Bis(4-clorofenil)-etanolo	n. 235						
	Bis(clorometil)etere	n. 484						
	Bis(N,N-dimetil-ditiocarbammato)di zinco	n. 932						
	1,1'-Bis(3,5-dimetil-morfolinocarbonil-metil)-4,4'-bipiridilio	n. 683						
	(Bis-dimetil-tiocarbamoil) disolfuro	n. 864						
(*) 163	1,3-Bis(2,3-epossipropossi)-benzene		101-90-6	603-065-00-9	T	23/24/25-40-43	23-24-44	
(*) 164	1,4-Bis(2,3-epossipropossi)-butano			603-072-00-7	Xn	20/21-36/38-43	26-28-37-/39	
(*) 165	2,2-Bis-à4-(2,3-epossipropossi)-fenilù-propano		1675-54-3	603-073-00-2	Xi	36/38-43	28-37/39	
	S-à1,2-Bis(etossi-carbonil)-etilù-O,O-dimetil-ditiofosfato	n. 598						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
(*) 166	Bisfenolo-A-epicloridrina, prodotto di reazione - Resine epossidiche- P.M. medio inf. o uguale a 700		25068-38-6	603-074-00-8	Xi	36/38-43	28-37/39	
167	Bis(1-idrossicicloesile) perossido			617-010-00-1	E-C	3-35	3/7/9-14-27-34 37/39	
(*) 168	2,5-Bis(idrossimetile)tetraidrofurano			603-062-00-2	Xi	36/37/38	39	
	Bis-(metossi-tiocarbonile) disolfuro	n. 412						
169	Bis(2,4,6-trinitrofenil)amina		131-73-7	612-018-00-1	E-T	2-26/27/28-33	35-36-44	
170	Bis(2,4,6-trinitrofenl)amina sale di am monio		2844-92-0	612-019-00-7	E-T	1-26/27/28-33	35-36-45	
171	Boro tribromuro			005-003-00-0	T	14-26/28-35	9-26-28-36-45	
172	Boro tricloruro		10294-34-5	005-002-00-5	T	14-26/28-34	9-26-28-36-45	
173	Boro trifluoruro		7637-07-2	005-001-00-X	T	14-26-35	9-26-28-36-45	
174	Bromo		7726-95-6	035-001-00-5	C	26-35	7/9-26	
175	Bromobenzene		108-86-1	602-060-00-9	Xi	10-38		
176	Bromoetano		74-96-4	602-055-00-1	Xn	20/21/22	28	
177	Bromofenoxim		73-85-1	609-032-00-5	Xn	20/22	2-13	
	Bromoformio	n. 876						
178	Bromophos-etile		4824-78-6	015-064-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
179	1-Bromopropano		106-94-5	602-019-00-5	F-T	11-26/27/28	7/9-29-45	
180	alfa-Bromotoluene			602-057-00-2	Xi	36/37/38	39	
181	Bromoxynil		1689-84-5	608-006-00-0	T	23/24/25	2-13-44	
182	Brucina		357-57-3	614-006-00-1	T	26/28	1-13-45	
183	Brucina sali			614-007-00-7	T	26/28	1-13-45	A
184	1,3-Butadiene		106-99-0	601-013-00-X	F	13	9-16-33	D
185	1,3-Butandiol-diacrilato			607-118-00-7	C	21-34-43	26-36/37/39	D
186	1,4-Butandiol-diacrilato			607-119-00-2	C	21-34-43	26-36/37/39	D
	Butandiol-glicidiletere	n. 164						
187	Butano		106-97-8	601-004-00-0	F	13	9-16-33	C
188	Butanolo, eccetto alcool terz-butilico		71-36-3 78-92-2 78-83-1	603-004-00-6	Xn	10-20	16	C
189	Butanone		78-93-3	606-002-00-3	F	11	9-16-23-33	
190	2-Butenale		4170-30-3	605-009-00-9	F-T	11-23-36/37/38	29-33-44	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
191	Butene		106-98-9 107-01-7 115-11-7	601-012-00-4	F	13	9-16-33	C
192	n-Butilamina		109-73-9	612-005-00-0	F-Xi	11-36/37/38	16-26-29	
(**) 193	2-terz-Butilaminoetile metacrilato		3775-90-4	607-128-00-1	Xi	36/38-43	26	D
	O-(4-terz-Butil-2-cloro-fenil)-O-metil-fosforamide	n. 291						
194	terz-Butil-8-cumile perossido			617-007-00-5	O-Xi	11-36/37/38	3/7/9-14-27-37/39	
	2-sec-Butil-4,6-dinitrofenil-isopropil-carbonato	n. 422						
195	2-terz-Butil-4,6-dinitrofenolo			609-030-00-4	T	23/24/25	2-13-44	
196	n-Butile acetato		123-86-4	607-025-00-1		10		
197	sec-Butile acetato terz-butile acetato isobutile acetato		105-46-4 540-88-5	607-026-00-7	F	11	16-23-29-33	C
(**) 198	n-Butile acrilato		141-32-2	607-062-00-3	Xi	10-36/37/38-43	9	D
199	Butile butirrato		109-21-7	607-031-00-4		10		C
200	Butile formiato		592-84-7 589-40-2 762-75-4	607-017-00-8	F	11	9-16-33	C
(**) 201	n-Butile metacrilato		97-88-1	607-033-00-5	Xi	10-36/37/38-43		D
	Butilene	n. 191						
202	terz-Butile perossido			617-001-00-2	O-Xi	11-37/38	3/7/9-14-27-37 39	
	Butiletilchetone	n. 467						
203	n-Butil-glicidil-etere		2426-08-06	603-039-00-7	Xn	20-43	24/25	
	Butilglicol	n. 207						
	Butilglicol acetato	n. 208						
204	Butilpropionato			607-029-00-3		10		C
	Butirraldeide	n. 68						
205	n-Butirronitrile		109-74-0	608-005-00-5	T	10-23/24/25	44	
(**) 206	1-Butossi-2,3-epossipropano		2426-08-06	603-039-00-7	Xn	20-43	24/25	
(**) 207	2-Butossietanolo		111-76-2	603-014-00-0	Xn	20/21/22-37	24/25	
208	2-Butossietil acetato		112-07-2	607-038-00-2	Xn	20/21	24	
209	3-Butossi-2-propanolo			603-052-00-8	Xi	36/38		

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
210	1-(2-Butossipropossi)-2-propanolo			603-050-00-7	Xn	21/22		
211	Cadmio cianuro		542-83-6	048-004-00-1	T	26/27/28-32-33 40	1/2-7-28-29-45	
212	Cadmio cloruro		10108-64-2	048-008-00-3	T	23/25-33-40	22-44	
213	Cadmio composti, esclusi il solfuro(CdS) , il solfoseleniuro(xCdS . yCdSe),i solfuri misti di cadmio e zinco(xCdS . yZnS) , i solfuri misti di cadmio e mercurio(xCdS . yHgS) e quelli espressamente indicati in questo allegato.			048-001-00-5	Xn	20/21/22	22	A
214	Cadmio esafluosilicato			048-005-00-7	T	23/25-33-40	22-44	
215	Cadmio fluoruro		7790-79-6	048-006-00-2	T	23/25-33-40	22-44	
216	Cadmio formiato		4464-23-7	048-003-00-6	T	23/25-33-40	22-44	
217.	Cadmio ioduro		7790-80-9	048-007-00-8	T	23/25-33-40	22-44	
218	Cadmio ossido		1306-19-0	048-002-00-0	T	23/25-33-40	22-44	
219	Calcio		7440-70-2	020-001-00-X	F	15	8-24/25-43	
220	Calcio carburo		75-20-7	006-004-00-9	F	15	8-43	
221	Calcio fosfuro		1305-99-3	015-003-00-2	F-T	15/29-28	1/2-22-43-45	
	Calcio idruro	n. 222						
222	Calcio iodruro		7789-78-8	001-004-00-5	F	15	7/8-24/25-43	
223	Calcio ipoclorito conc. Cl attivo sup. a 39%		7778-54-3	017-012-00-7	O-C	8-31-34	2-26-43	
224	Calcio polisolfuri			016-005-00-6	Xi	31-36/37/38	28	
225	Calcio solfuro		20548-54-3	016-004-00-0	Xi	31-36/37/38	28	
	Calomelano	n. 615						
226	Camfeclor		8001-35-2	602-044-00-1	T	23/24/25-36/38	2-13-44	
	Canfene clorurato	n. 404						
227	Carbaril		63-25-2	006-011-00-7	Xn	20/22-37	2-13	
228	Carbofenothion		786-19-6	015-044-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
229	Carbofuran		1563-77-2	006-026-00-9	T	26/28	1-13-45	
230	Carbonile cloruro		75-44-5	006-002-00-8	T	26	7/9-24/25-45	
231	Carbonio ossido		630-08-0	006-001-00-2	F-T	12-23	7-16	
232	Carbonio solfuro		75-15-0	006-003-00-3	F-T	12-26	27-29-33-43-45	
	Carbonio tetracloruro	n. 850						
	Chinone	n. 156						
233	Chlordecone		143-50-0	606-019-00-6	T	23/24/25	2-13-44	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
234	Chlorfenac		85-34-7	607-074-00-9	Xn	20/21/22	2-13	
235	Chlorfenétol			603-049-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
236	Chlorfenprop-metile			607-075-00-4	Xn	20/22	2-13	
237	Chlorfonium		115-78-6	015-085-00-X	T	23/24/25	2-13-44	A
238	Chlortion		500-28-7	015-042-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
	O-(4-Cianofenil)-O,O-dimetil-tiofosfato	n. 299						
239	Cianogeno		460-19-5	608-011-00-8	F-T	11-23	23-44	
240	2-Cian-propan-2-olo		75-86-5	608-004-00-X	T	26/27/28	7/9-27-45	
241	Ciantoato			015-070-00-8	T	26/27/28	1-13-45	
	Cianurile cloruro	n. 891						
242	Ciclobutan-1,3-dione		15506-53-3	606-008-00-6	F	11	9-16-33	
243	Cicloesano		110-82-7	601-017-00-1	F	11	9-16-33	
244	Cicloesanolo		108-93-0	603-009-00-3	Xn	20/22-37/38	24/25	
245	Cicloesanone		108-94-1	606-010-00-7	Xn	10-20	25	
(**) 246	Cicloesilamina		108-91-8	612-050-00-6	C	10-21/22-34	36/37/39	
	2-Cicloesil-4,6-dinitrofenolo	n. 413						
247	Cicloesile acrilato		3066-71-5	607-116-00-6	Xi	37/38		D.
	3-Ciclo-ottil-1,1-dimetilurea	n. 251						
248	Ciclopentano		287-92-3	601-030-00-2	F	11	9-16-29-33	
249	Ciclopentanone		120-92-3	606-025-00-9	Xi	10-36/38	23	
250	Ciclopropano		75-19-4	601-016-00-6	F	13	9-16-33	
251	Cicluron		2163-69-1	006-027-00-4	Xn	20/21/22	2-13	
252	Ciexatin			050-002-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
253	Cinerina I		97-12-1	613-025-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
254	Cinerina II		121-20-0	613-026-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
255	Cloralio idrato			605-014-00-6	T	25-36/38	25-44	
256	Cloralose		14798-36-8	605-013-00-0	Xn	20/22	2-16-24/25-28	
257	Cloramina T (sale sodico)			616-010-00-9	Xi	36/37/38	2-7-15	
258	Clordano		57-74-9	602-047-00-8	Xn	20/21/22-36/38	2-13	
259	Clordimeform			650-007-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
	Clorfenamidina	n. 259						
260	Clorfenvinfos		470-90-6	015-071-00-3	T	26/27/28	1-13-28-45	
	Cloridrina etilenica	n. 270						
261	Cloridrina solforica		7790-94-5	016-017-00-1	C	14-35-37	26	
262	Cloro		7782-50-5	017-001-00-7	T	23-36/37/38	7/9-44	
263	Cloroacetilcloruro		79-04-9	607-080-00-1	C	34-37	9-26	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
264	Cloroacetonitrile			608-008-00-1	T	23/24/25	44	
265	Cloroanilina (mono-, di- e tri-)		27134-26-5 27134-27-6 18487-39-3	612-010-00-8	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
266	2-Clorobenzaldeide		89-98-5	605-011-00-X	C	34	26	
	Clorobenzene	n. 674						
267	2-Cloro-1,3-butadiene		31900-55-7	602-036-00-8	F-Xn	12-20	9-16-29-33	D
268	1-Clorobutano			602-059-00-3	F	11	9-16-29	
	(4-Cloro-but-2-inil)-N-(3-cloro-fenil)-carbammato	n. 140						
	p-Cloro-m-cresolo	n. 274						
	O-à2-Cloro-1-(2,4-dicloro-fenil)-vinilù-O,O-dietilfosfato	n. 260						
	(2-Cloro-3-dietilamino-1-metil-3-osso-prop-1-enil)-dimetil-fosfato	n. 544						
	2-Cloro-4-dimetilamino-6-metil-pirimidina	n. 288						
(**) 269	1-Cloro-2,3-epossipropano		106-89-8	603-026-00-6	T	10-26/27/28-40	9-36/37-39-45	
270	2-Cloroetanolo		107-07-3	603-028-00-7	T	26/27/28	7/9-28-45	
	2-(4-Cloro-6-etilamino-1,3,5-triazin-2-il)amino-2-metil-propionitrile	n. 298						
	(2-Cloroetil)-trimetilammonio	n. 273						
	O-à4-(4-Clorofenilazo)-fenilù-O,O-dimetil-tiofosfato	n. 138						
	(4-Clorofenil)-benzensolfonato	n. 531						
	2-à2-(4-Cloro-fenil-2-fenil)-acetilù-indan-1,3-dione	n. 282						
271	4-(2-Cloro-fenilidrazone)-3-metil-4H-5-isossazolone		570-76-7	650-008-00-9	T	23/24/25	2-13	
	N'-(4-Clorofenil)-N-metossi-N-metilurea	n. 682						
	3-à1-(4-Cloro-fenil)-3-osso-butilù-4-idrossi-cumarina	n. 292						
272	Clorofenolo (m) (o) (p)			604-008-00-0	Xn	20/21/22	2-28	C
	Cloroformio	n. 884						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	S-à(2-Cloro-1-ftalimido)etilù-O,O-dietil-ditiofosfato	n. 316						
273	Cloromequat		999-81-5	007-003-00-6	Xn	20/21/22	2-13	A
274	4-Cloro-3-metilfenolo		59-50-7	604-014-00-3	Xn	21/22/38	26-28	
275	3-Cloro-2-metil-1-propene		513-47-3	602-032-00-6	F-Xn	11-20	9-16-29-33	
	N'-(3-Cloro-4-metossi-fenil)-N,N-dimetilurea	n. 671						
276	Cloronitroanilina			610-006-00-0	T	26/27/28-33	28-36/37-45	C
277	p-Cloronitrobenzene		100-00-5	610-005-00-5	T	23/24/25-33	28-37-44	
	O-(3-Cloro-4-nitro-fenil)-O,O-dimetiltiofosfato	n. 238						
	O-(4-Cloro-3-nitro-fenil)-O,O-dimetiltiofosfato	n. 739						
278	1-Cloro-1-nitropropano		600-25-9	610-007-00-6	Xn	20/22		
	Cloropicrina	n. 886						
279	Cloroprene		126-55-7	602-036-00-8	F-Xn	12-20	9-16-29-33	D
280	3-Cloropropene		107-05-1	602-029-00-X	F-T	11-26	16-29-33-45	D
	N'-(4-Cloro-o-tolil)-N',N'-dimetilformamidina	n. 259						
281	alfa-Clorotoluene		100-44-7	602-037-00-3	Xi	36/37/38	39	
282	Clorphacinone			606-014-00-9	T	26/27/28	1-13-44	
283	Clorpirifos		2921-88-2	015-084-00-4	T	23/24/25	2-13-44	
284	Clortiamid		1918-13-4	616-005-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
285	Colchicina		64-86-8	614-005-00-6	T	26/28	1-13-45	
286	4-CPA		122-88-3	607-073-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
	Cresile glicidile etere	n. 463						
287	Cresolo (o) (m) (p)		1319-77-3	604-004-00-9	T	24/25-34	2-28-44	C
288	Crimidina		535-89-7	613-004-00-8	T	26/27/28	1-13-45	
	Cromile cloruro	n. 289						
289	Cromo ossicloruro		7791-14-2	024-005-00-2	O-C	8/35	7/8-22-28	
(**) 290	Cromo triossido		1333-82-0	024-001-00-0	O-C	8/35/43	28	
	Crotonaldeide	n. 190						
291	Crufomato		299-86-5	015-074-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
292	Cumacloro		81-82-3	607-057-00-6	Xn	20/21/22	2-13-44	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
293	Cumafuril			607-058-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
294	Cumaphos		56-72-4	015-038-00-3	T	26/27/28	1-13-28-45	
295	Cumatetralil		5836-29-3	607-059-00-7	T	26/27/28	1-13-45	
	Cumene	n. 784						
296	Cumene idroperossido			617-002-00-8	O-C	11/35	3/7/9-14-27-37/39	
297	Cumitoato		572-48-5	015-086-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
298	Cyanazine			613-013-00-7	T	23/24/25	2-13-44	
299	Cyanophos		2636-26-2	015-087-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
300	2,4-D		94-75-7	607-039-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
301	Dazomet		533-74-4	613-008-00-X	Xn	21/22	2-13	
302	2,4-DB			607-083-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
303	2,4-DB sali			607-084-00-3	Xn	20/21/22	2-13	A
304	DDT		50-29-3	602-045-00-7	T	23/24/25-33	2-13-44	
	Decacloropentaciclo à5,2,1,0(2,6),0(3,9),0(5,8)ù-4-decanone	n. 233						
305	Decarbofurano			006-022-00-7	T	23/24/25	2-13-44	
306	Demeton-O		8000-97-3	015-028-00-9	T	26/27/28-36	1-13-26-28-45	
307	Demeton-O-metile		867-27-6	015-030-00-X	T	23/24/25-36	2-13-26-44	
308	Demeton-S-metile		919-86-8	015-031-00-5	T	23/24/25-36	2-13-26-44	
309	Demeton-S-metilsolfone			015-078-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
310	Demeton-S		126-75-0	015-029-00-4	T	26/27/28-36	1-13-26-28-45	
311	Desmetrin		1014-69-3	613-007-00-4	Xn	20/21/22	2-13	
312	2,4-D esteri e sali			607-040-00-3	Xn	20/21/22	2-13	A
313	N,N'-Diacetilbenzidina			612-044-00-3	Xn	20/21/22	22-36	
	Diacetonalcool	n. 569						
314	Diacetonalcool, tecnico		123-42-2	603-017-00-7	F-Xi	11-36	7-16-24/25	
315	Diacrilato di 2,2-dimetilpropan-1,3-propandiolo			607-112-00-4	T	24-36/38-43	28-39-44	D
316	Dialifos			015-088-00-6	T	26/27/28	1-13-45	
317	Diallate			006-019-00-0	Xn	22-36/38	2-13-39	
	N,N-Diallilcloracetamide	n. 75						
318	Diallile ftalato		131-17-9	607-086-00-4	Xn	22	24/25	
319	4,4'-Diaminodifenilmetano			612-051-00-1	Xn	20/21/22		
(**) 320	1,2-Diaminoetano		107-15-3	612-006-00-6	C	10-21/22-34-43	9-26-36/37/39	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	S-à(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)-metilù-O,O-dimetil-ditiofosfato	n. 609						
321	Dianidride 1,2,4,5-benzentetracarbossilica		89-32-7	607-098-00-X	Xi	36/37/38	25	
322	Dianidride 3,3',4,4'-benzofenontetracarbossilica		2421-28-5	607-100-00-9	Xi	36/37	25	
323	Dianidride 1,2,3,4-ciclopentantetracarbossilica			607-104-00-0	Xi	36/37	25	
	Dianidride piromellitica	n. 321						
	o-Dianisidina	n. 410						
324	o-Dianisidina sali			612-037-00-5	T	26/27/28-33	28-36/37-45	A
(*) 325	3,6-Diazaottan-1,8-diamina		112-24-3	612-059-00-5	C	21-34-43	26-36/37/39	
326	Diazinone		333-41-5	015-040-00-4	T	23/24/25	2-13-44	
327	Dibenzoile perossido			617-008-00-0	E-Xi	3-36/37/38	3/7/9-14-27-34 37/39	
328	1,2-Dibromo-3-cloropropano		96-12-8	602-021-00-6	T	25-36/38	28-44	
	O-(1,2-Dibromo-2,2-dicloro-etil)-O,O-dimetil-fosfato	n. 693						
329	1,2-Dibromoetano		106-93-4	602-010-00-6	T	23/24/25	25-44	
	3,5-Dibromo-4-idrossi-benzonitrile	n. 181						
330	Dibromometano		74-95-3	602-003-00-8	Xn	20	24	
331	Di-n-butilamina (§)e di sec-butilamina		111-92-2 §	612-049-00-0	Xn	10-20/21/22		
332	Di-n-butil-etere		142-96-1	603-054-00-9	Xi	10-36/37/38		
333	Dicamba		1918-00-9	607-043-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
334	Dicamba sali			607-044-00-5	Xn	20/21/22	2-13	A
335	Dichetene		674-82-8	606-017-00-5	Xn	10-20	3	D
336	Dichlone		117-80-6	606-018-00-0	Xn	20/21/22-38	2-13	
(*) 337	Dicicloesilamina		101-83-7	612-066-00-3	C	22-34	36/37/39	
338	Dicicloesilammonio nitrito		3129-91-7	007-009-00-9	Xn	20/22	15-41	
(*) 339	Dicicloesilmetan-4,4'-diisocianato		5124-30-1	615-009-00-0	T	23-36/37/38-42/43	26-28-38-45	
340	Diclofenthion		97-17-6	015-068-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
341	Diclofluanide		1085-98-9	616-006-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
342	Dicloroacetile cloruro		79-36-7	607-067-00-0	C	35	9-26	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
343	1,2-Diclorobenzene		95-50-1	602-034-00-7	Xn	20	24/25	
344	1,4-Diclorobenzene		116-46-7	602-035-00-2	Xn	22	2-24/25	
	4-4'-Diclorobenzoile perossido	n. 162						
345	1,1-Dicloroetano		75-34-3	602-011-00-1	F-Xn	12-20	7-16-29-33	
346	1,2-Dicloroetano		107-06-2	602-012-00-7	F-Xn	11-20	7-16-29-33	
347	1,1-Dicloroetilene		75-35-4	602-025-00-8	F-Xn	12-20-40	7-16-29	D
348	1,2-Dicloroetilene		540-59-0	602-026-00-3	F-Xn	11-20	7-16-29	
349	2,2'-Dicloroetiletere		111-44-4	603-029-00-2	T	10-26/27/28-40	7/9-27-38-45	
	N'-(3,4-Dicloro-fenil)-N-N'-dimetil-urea	n. 443						
	(2,4-Diclorofenil)(fenil)(5-pirimidinil) metanolo	n. 874						
	3-(3,4-Dicloro-fenil)-1-metossi-1-metil-urea	n. 591						
	N-(3,4-Diclorofenil)-propionamide	n. 779						
350	2,4-Diclorofenolo		120-83-2	604-011-00-7	Xn	22-36/38	26-28	
	2-(2,4-Diclorofenossi)-etile solfato acido	n. 440						
	N'-(Diclorofluorometil)tio-N,N-dimetil-N'-fenil-sulfonildiamide	n. 341						
(*) 351	N-(Diclorofluorometiltio)-ftalimide			616-012-00-X	Xi	38	28	
352	Diclorometano		75-09-2	602-004-00-3	Xn	20	24	
	2,3-Dicloro-1,4-naftochinone	n. 336						
353	1,1-Dicloro-1-nitroetano		594-72-9	610-002-00-9	T	23/24/25	26-44	
354	Dicloropropano			602-020-00-0	F-Xn	11-20	9-16-29-33	C
355	1,3-Dicloropropene, 2,3-dicloropropene e 3,3-dicloropropene		542-75-6 78-88-6	602-030-00-5	F-Xn	11-22	9-16-29-33	C
356	1,1-Dicloropropene e 1,2-dicloropropene		563-57-5 563-58-6 563-54-2	602-031-00-0	F-T	11-25	16-29-33-44	C
	2,6-Dicloro-tiobenzamide	n. 284						
357	alfa,alfa-Diclorotoluene		98-87-3	602-058-00-8	Xi	36/37/38	39	
	(2,2-Dicloro-vinil)-dimetil-fosfato	n. 361						
358	O-(2,2-Dicloro-vinil)-O-metil-O-(2-etil-solfinil-etil)-fosfato		7076-53-1	015-077-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
359	Diclorprop		120-36-5	607-045-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
360	Diclorprop sali			607-046-00-6	Xn	20/21/22	2-13	A

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
361	Diclorvos		62-73-7	015-019-00-X	T	23/24/25	2-13-44	
362	Dicofol		115-32-2	603-044-00-4	Xn	20/21/22	2-13	
363	Dicrotophos			015-073-00-4	T	26/27/28	1-13-28-45	
364	Dicumarina		66-76-2	607-060-00-2	T	23/24/25	2-13-44	
365	8,8'-Dicumile perossido			617-006-00-X	O-Xi	11-36/37/38	3/7/9-14-27-37/39	
366	Dieldrin		60-57-1	602-049-00-9	T	23/24/25	2-13-44	
(*) 367	1,2:3,4-Diepossi-butano		1464-53-5	603-060-00-1	T	23/24/25-36/37/38-40-42/43	23-24-44	
(*) 368	Dietanolamina		111-42-2	603-071-00-1	Xi	36/38	26	
369	Dietilamina		109-89-7	612-003-00-X	F-Xi	11-36/37	16-26-29	
370	2-Dietilaminoetanolo		100-37-8	603-048-00-6	Xi	36/37/38	28	
(**) 371	2-Dietilaminoetile metacrilato			607-127-00-6	Xn	20-36/38-43	26	D
	3-(Dietilamino)-propilamina	n. 373						
372	N,N-Dietilanilina		91-66-7	612-054-00-8	T	23/24/25-33	28-37-44	
	O,O-Dietil-O-(4-bromo-2,5-dicloro-fenil)-tiofosfato	n. 178						
	Dietilchetone	n. 737						
	O,O-Dietil-S-à(2-cian-2-metil-etil)-carbamoilù-metil-tiofosfato	n. 241						
	N,N-Dietil-S-2-cloro-allil-ditiocarbammato	n. 837						
	O,O-Dietil-S-à(4-cloro-fenil-tio)-metilù-ditiofosfato	n. 228						
	O,O-Dietil-O-(3-cloro-4-metilcumarin-7-il)-monotiofosfato	n. 294						
	O,O-Dietil-S-à(6-cloro-2-osso-1,3-benzossazolin-3-il)-metilù-ditiofosfato	n. 543						
(*) 373	N,N-Dietil-1,3-diaminopropano			612-062-00-1	C	10-21/22-34-43	26-36/37/39	
	O,O-Dietil-O-(2,4-dicloro-fenil)-tiofosfato	n. 340						
	O,O-Dietil-S-à(2,5-dicloro-fenil-tio)-metilù-ditiofosfato	n. 527						
	O,O-Dietil-O-(2-dietilamino-6-metil-p	n. 758						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
(**) 374	Dietilenglicol diacrilato			607-120-00-8	T	24-36/38-43	28-39-44	D
	Dietilenglicol dinitrato	n. 418						
375	Dietile solfato		64-67-5	016-027-00-6	T	22-23-44	26-37	
	0,0-Dietil-S-(2-etilsulfinil-etil)-ditiofosfato	n. 721						
	0,0-Dietil-S-(2-etiltio-etil)-ditiofosfato	n. 441						
	0,0-Dietil-0-(2-etiltio-etil)-tiofosfato	n. 306						
	0,0-Dietil-S-(2-etiltio-etil)-tiofosfato	n. 310						
	0,0-Dietil-S-(etiltio-metil)-ditiofosfato	n. 540						
	0,0-Dietil-S-(N-etossi-carbonil-N-metil-carbamoil-metil)-ditiofosfato	n. 606						
	0,0-Dietil-S-(N-isopropil-carbamoil-metil)-ditiofosfato	n. 791						
	0,0-Dietil-0-(2-isopropil-4-metil-pirimidin-6-il)-tiofosfato	n. 326						
376	0,0-Dietil-0-(4-metilcumarin-7-il)-tiofosfato		299-45-6	015-076-00-0	T	26/27/28	-28-45	
	0,0-Dietil-N-(4-metil-1,3-ditiolan-2-iliden)-fosforoamidato	n. 612						
	0,0-Dietil-0-(3-metil-1H-pirazol-5-il)-fosfato	n. 752						
	0,0-Dietil-0-(4-metilsulfinil-fenil)-tiofosfato	n. 532						
	0,0-Dietil-0-(4-nitro-fenil)-tiofosfato	n. 726						
	0,0-Dietil-S-à(4-osso-3H-1,2,3-benzotriazin-3-il)metilù-ditiofosfato	n. 134						
	0,0-Dietil-0-(6-osso-7,8,9,10-tetraidro-benzo(c)cromen-3-il)-tiofosfato	n. 297						
	0,0-Dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridile) tiofosfato	n. 283						
377	1,1-Dietossi-etano		105-57-7	605-015-00-1	F-Xi	11-36/38	9-16-33	
	2-à(Dietossi-tiofosforilossi)-iminoù-2-fenil-acetonitrile	n. 554						
378	Difenamide		957-51-7	616-007-00-2	Xn	20/21/22	2-13	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
379	Difenilamina			612-026-00-5	T	23/24/25-33	28-36/37-44	
380	Difenilmetan-4,4'-diisocianato isomeri e omologhi miscela di(1)e(2)		101-68-8 9016-87-9	615-005-01-6	Xn	20-36/37/38-42	26-28-38-45	
(**) 381	Difenilmetan-4,4'-diisocianato(MDI)(1) Difenilmetan-2,4'-diisocianato(MDI)(2) Difenilmetan-2,2'-diisocianato(MDI)(3) Miscela di (1) (2) (3)		101-68-8 5873-54-1 2536-05-2	615-005-00-9	Xn	20-36/37/38-42	26-28-38-45	C
382	Digitossina		71-63-6	614-022-00-9	T	23/25-33	1-44	
	2,3-Diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-metilcarbammato	n. 229						
383	1,3-Diidrossibenzene		108-46-3	604-010-00-1	Xn	22-36/38	26	
384	1,4-Diidrossibenzene		123-31-9	604-005-00-4	Xn	20/22	2-24/25-39	
	Diisobutilchetone	n. 400						
	N,N'-Diisopropil-fosforodiamido-fluoruro	n. 673						
385	Dilauroile perossido			617-003-00-3	O-Xi	11-36/37/38	3/7/9-14-27-37/39	
386	Dimefox		115-26-4	015-061-00-9	T	26/27/28	1-13-28-45	
387	Dimetan		122-15-6	006-010-00-1	T	26/27/28	1-13-45	
388	Dimetilacetale		534-15-6	605-007-00-8	F	11	9-16-33	
389	N,N-Dimetilacetamide		127-19-5	616-011-00-4	Xn	20/21-36	26-28-36	
	O,S-Dimetil-N-acetil-tiofosforamidato	n. 1						
	4-(Dimetilamino)-benzen-diazosolfonato di sodio	n. 519						
	(2-Dimetil-amino-5,6-dimetil-4-pirimidinil)-N,N-dimetilcarbammato	n. 757						
390	2-Dimetilaminoetanolo		108-01-0	603-047-00-0	Xi	10-36/37/38	28	
(**) 391	2-Dimetilaminoetile metacrilato		2867-47-2	607-132-00-3	Xn	21/22-36/38-43	26-28	D
	3-(Dimetilamino-metilene-imino)-fenil-metilcarbammato	n. 541						
	(4-Dimetilamino-3-metil-fenil)-N-metilcarbammato	n. 91						
	3-(Dimetilamino)-propilamina	n. 397						
392	N,N-Dimetilanilina		121-69-7	612-016-00-0	T	23/24/25-33	28-37-44	
393	3,3'-Dimetilbenzidina		119-93-7	612-041-00-7	Xn	20/21/22	22-36	
394	N,N'-Dimetilbenzidina		8810-74-4	612-043-00-8	Xn	20/21/22	22-36	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
395	1)3-(Dimetil-carbamoil-ossi)-5-metil-1H-pirazol-1-il-(N,N-dimetil-carbammide) 2)(3-metil-1H-pirazol-5-il)-N,N-dimetil-carbammato)			006-040-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
396	1,4-Dimetilcicloesano		589-90-2	601-019-00-2	F	11	9-16-33	
(*) 397	N,N-Dimetil-1,3-diaminopropano			612-061-00-6	C	10-22-34-43	26-36/37/39	
398	Dimetildiclorosilano			014-003-00-X	F-Xi	11-36/37/38		
	N,N-Dimetil-2,2-difenilacetamide	n. 378						
	O,O-Dimetil-O-cis-(2-dimetil-carbamoil-1-metil-vinil)-fosfato	n. 363						
	1,1'-Dimetil-4,4'-dipiridinio	n. 725						
399	Dimetile carbonato		616-38-6	607-013-00-6	F-Xn	11-20/21/22	9-29	
400	2,6-Dimetil-eptan-4-one		108-83-8	606-005-00-X	Xi	10-37	24	
401	Dimetiletere		115-10-6	603-019-00-8	F	13	9-16-33	
	O,O-Dimetil-S-(2-etil-solfinil-etil)-monotio-fosfato	n. 717						
	O,O-Dimetil-S-(2-etiltio-etil)-ditiofosfato	n. 862						
	O,O-Dimetil-O-(2-etiltio-etil)-tiofosfato	n. 307						
	O,O-Dimetil-S-(2-etiltio-etil)-tiofosfato	n. 308						
	O,O-Dimetil-S-àalfa-(etossicarbonil)-benzilù-ditiofosfato	n. 536						
402	N,N-Dimetilfenilendiamina (o,m,p)		2836-03-5 2836-04-6 99-98-6	612-031-00-2	T	23/24/25	28-44	C
403	N,N-Dimetilformamide		68-12-2	616-001-00-X	Xn	20/21-36	26-28-36	
	O,O-Dimetil-S-(N-formil-N-metil-carbamoil-metil)-ditiofosfato	n. 542						
	O,S-Dimetil-fosforamidotioato	n. 624						
	O,O-Dimetil-S-ftalimidometil-ditiofosfato	n. 553						
	Dimetilglicol	n. 411						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	0,0-Dimetil-0-cis-(2-N-metilcarbamoil-1-metil-vinil)-fosfato	n. 679						
	0,0-Dimetil-S-2-(1-metil-carbamoil-etiltio)-etil-monotiofosfato	n. 920						
	0,0-Dimetil-S-(N-metil-carbamoil)-metil-ditiofosfato	n. 409						
	0,0-Dimetil-S-(N-metil-carbamoil-metil)-tiofcsfato	n. 715						
404	2,2-Dimetil-3-metilen-norbornano clorurato		8001-35-2	602-044-00-1	T	23/24/25-36/38	2-13-44	
	0,0-Dimetil-0-(3-metil-4-metiltio-fenil)-tiofosfato	n. 535						
	0,0-Dimetil-0-(3-metil-4-nitro-fenil)-monotiofosfato	n. 526						
	(3,5-Dimetil-4-metiltio-fenil)-N-metil-carbammato	n. 664						
	0,0-Dimetil-S-à(2-metossi-1,3,4(4H)-tiadiazol-5-on-4-il)-metilù-ditiofosfato	n. 628						
	0,0-Dimetil-S-à(morfolin-carbonil)-metilù-ditiofosfato	n. 685						
	0,0-Dimetil-0-(4-nitro-fenil)-monotiofosfato	n. 727						
	0,0-Dimetil-S-à(4-osso-3H-1,2,3-benzotriazin-3-il)-metilù-ditiofosfato	n. 135						
	(5,5-Dimetil-3-osso-cicloes-1-en-il)-N,N-dimetil-carbammato	n. 387						
405	2,4-Dimetil-3-pentanone		565-80-0	606-028-00-5	F	11	16-23	
	3,5-Dimetil-peridro-1,3,5-tiadiazin-2-tione	n. 301						
406	Dimetilpropano		483-82-1	601-005-00-6	F	13	9-16-33	
407	Dimetilsolfato		77-78-1	016-023-00-4	T	26/27-40	7/9-24/25-26-45	
408	N,N-Dimetiltoluidina			612-056-00-9	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
	0,0-Dimetil-(2,2,2-Tricloro-1-idrossi-etil)-fosfonato	n. 878						
	2,6-Dimetil-4-tridecilmorfolina	n. 896						
409	Dimetoato		60-51-5	015-051-00-4	Xn	20/21/22	2-13	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
410	3,3'-Dimetossibenzidina		119-90-4	612-036-00-X	T	26/27/28-33	36/37-28-45	
411	1,2-Dimetossietano		110-71-4	603-031-00-3	Xn	10-20-19	24/25	
412	Dimexano		1468-37-7	016-024-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
413	Dinex		131-89-5	609-028-00-3	T	23/24/25	2-13-44	
414	Dinex sali ed esteri			609-029-00-9	T	23/24/25	2-13-44	A
415	2,4-Dinitroanilina		97-02-9	612-040-00-1	T	26/27/28-33	28-36/37-45	
416	Dinitrobenzene		25154-54-5	609-004-00-2	T	26/27/28-33	28-36/37-45	C
417	Dinitroclorobenzene			610-003-00-4	T	23/24/25-33	28-37-44	C
	4,6-Dinitro-o-cresolo	n. 444						
418	Dinitrodiglicol		693-21-0	603-033-00-4	E-T	3-26/27/28-33	33-35-36/37-45	
	O-(2,4-Dinitrofenil)-3,5-dibromo-4-idrossi-benzaldossima	n. 177						
419	Dinitrofenolo		25550-58-7	609-016-00-8	T	23/24/25-33	28-37-44	C
420	Dinitrofenolo sali			609-017-00-3	T	23/24/25-33	28-37-44	A
421	Dinitrotoluene		25321-14-6	609-007-00-9	T	23/24/25-33	28-37-44	C
422	Dinobuton		973-21-7	006-028-00-X	T	23/24/25	2-13-44	
423	Dinocap			609-023-00-6	Xn	20/22	2-13	
424	Dinocton			609-027-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
425	Dinosam		4097-36-3	609-033-00-0	T	23/24/25	2-13-44	
426	Dinosam sali ed esteri			609-034-00-6	T	23/24/25	2-13-44	A
427	Dinoseb		88-85-7	609-025-00-7	T	26/27/28	1-13-44	
428	Dinoseb sali ed esteri			609-026-00-2	T	23/24/25	2-13-44	A
429	Dinoterb			609-030-00-4	T	23/24/25	2-13-44	
430	Dinoterb sali ed esteri			609-031-00-X	T	23/24/25	2-13-44	A
	1,4-Diossan-2,3-diil-bis(O,O-dietil-ditiofosfato)	n. 434						
431	1,4-Diossano		123-91-1	603-024-00-5	F-Xn	11-19-20	9-16-33	
	9,10-Diosso-1,4-ditia-antracen-2,3-dicarbonitrile	n. 442						
	à2-(1,3-Diossolan-2-il)-fenileù-N-metil carbammato	n. 433						
432	1,3-Diossolano		646-06-0	605-017-00-2	F	11	16	
433	Dioxacarb			006-029-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
434	Dioxathion		78-34-2	015-063-00-X	T	26/27/28	1-13-28-45	
	Dipentene	n. 610						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
435	Di-n-propilamina e di-isopropilamina		142-84-7 108-18-9	612-048-00-5	F-Xi	11-36/37/38	9-16	
	Dipropilchetone	n. 468						
	Dipropilenglicole etere monobutilico	n. 210						
	Dipropilentriamina	n. 132						
436	Di-n-propiletere e di-isopropiletere		108-20-3	603-045-00-X	F	11-19	9-16-33	
437	Diquat, e i suoi sali		2764-72-9	613-005-00-3	T	26/27/28	1-13-45	A
438	Distillati di petrolio e di catrame di carbon fossile(se il punto di infiammabilita' e' inferiore a 21 C); vedere anche 650-001-00-0			650-001-01-8	F	11	9-16-29-33	
439	Distillati di petrolio e di catrame di carbon fossile(se il punto di infiammabilita' e' compreso tra 21 C e 55 C); vedere anche 650-001-00-0			650-001-02-5		10		
	Distillati di petrolio e di catrame di	n.9999						
440	Disul		136-78-7	016-025-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
441	Disulfoton		298-04-4	015-060-00-3	T	26/27/28	1-13-28-45	
442	Dithianon			613-021-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
	1,3-Ditiolo(4,5,b)-chinossalin-2-tione	n. 861						
443	Diuron		330-54-1	006-015-00-9	Xi	36/37/38	2-13	
444	DNOC		534-52-1	609-020-00-X	T	26/27/28-33	1-13-28-45	
445	DNOC sale di ammonio			609-022-00-0	T	26/27/28-33	1-13-28-45	
446	DNOC sali di potassio e di sodio			609-021-00-5	T	23/24/25-33	2-13-44	
	Dodecilguanidina acetato	n. 447						
447	Dodina		2439-10-3	607-076-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
448	Drazoxolon		570-76-7	650-008-00-9	T	23/24/25	2-13	
449	Efedrina			614-023-00-4	Xn	22	22-25	
450	Efedrina sali			614-024-00-X	Xn	22	22-25	A
451	Endosulfan		115-29-7	602-052-00-5	T	23/24/25-36/38	2-13-44	
452	Endothal-sodio		129-67-9	607-055-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
453	Endothion		2778-04-3	015-049-00-3	T	23/24/25	2-13-44	
454	Endrin		72-20-8	602-051-00-X	T	26/27/28	1-13-28-45	
	Epicloridrina	n. 269						
455	EPN		2104-64-5	015-036-00-2	T	26/27/28	1-13-28-45	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	3,6-Epossi-cicloesan-1,2-dicarbossilato disodico	n. 452						
(*) 456	1-Epossietil-3,4-epossicicloesano		4223-10-3	603-066-00-4	T	23/24/25-40	23-24-44	
(*) 457	1,2-Epossi-3-fenossipropano		122-60-1	603-067-00-X	Xn	21-43	24/25	
458	1,2-Epossipropano		75-56-9	603-055-00-4	F-Xn	12-20/21/22	9-16-26-29	
459	1,3-Epossipropano		503-30-0	603-058-00-0	F-Xn	11-20/21/22	9-16-26-29	
(*) 460	2,3-Epossi-1-propanolo		556-52-5	603-063-00-8	T	23-21/22-36/37 38-42/43	44	
(**) 461	2,3-Epossipropile acrilato		106-90-1	607-117-00-1	T	23/24/25-34-43	26-36/37/39-44	D
(**) 462	2,3-Epossipropile metacrilato		106-91-2	607-123-00-4	Xn	20/21/22-36/38 43	26-28	D
463	1,2-Epossi-3-tolilossi-propano		26447-14-3	603-056-00-X	Xi	38	26/28	C
464	Eptacloro		76-44-8	602-046-00-2	T	23/24/25-36/38	2-13-44	
	1,4,5,6,7,8,8-Eptacloro-3a,4,7,7a-tetra idro-4,7-endo-metano-indene	n. 464						
465	Eptano		142-82-5	601-008-00-2	F	11	9-16-23-29-33	C
466	2-Eptanone		110-43-0	606-024-00-3	Xn	10-22	23	
467	3-Eptanone		106-35-4	606-003-00-9	Xn	10-20-36	24	
468	4-Eptanone		123-19-3	606-027-00-X		10	23	
469	EPTC		759-94-4	006-030-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
470	Erbon		136-25-4	607-077-00-5	Xn	20/21/22-36/37	2-13	
	1,2,3,4,10,10-Esacloro-1,4,4a,5,8, 8a-esaidro-1,4-endo-5,8-eso-dimetano-naftalene	n. 73						
	1,2,3,4,10,10-Esacloro-1,4,4a,5,8,8a-esaidro-1,4-endo-5,8-endo-dimetano-naftalene	n. 583						
	6,7,8,9,10,10-Esacloro-1,5,5a,6,9,9a-esaidro-6,9-metano-2,3,4-benzoàoù-diossatiepina-3-ossido	n. 451						
	1,2,3,4,5,6-Esacloro-cicloesano	n. 558						
	alfa-1,2,3,4,5,6-Esacloro-cicloesano	n. 590						
	1,2,3,4,10,10-Esacloro-6,7-epossi-1,4,4a 5,6,7,8,8a-ottaidro-1,4-endo-5,8-eso-dimetano-naftalene	n. 366						
	Esaclorofene	n. 646						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
471	Esafluoropropene		116-15-4	602-061-00-4	Xn	20-37	41	
472	Esafluorosilicati alcalini (Na,K,NH4)			009-012-00-0	T	23/24/25	1/2-26-44	A
473	Esafluosilicati, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			009-013-00-6	Xn	22	2-13-24/25	A
(*) 474	Esametilen-1,6-diisocianato		882-06-0	615-011-00-1	T	23-36/37/38-42	26-28-38-45	
475	1,6-Esandiol diacrilato			607-109-00-8	Xi	36/38-43	39	D
	Esanitrodifenilamina	n. 169						
476	1-Esanolo		111-27-3	603-059-00-6	Xn	22	24/25	
477	Esano-miscela di isomeri contenente piu' di 5% di n-Esano		110-54-3	601-007-00-7	F	11	9-16-23-29-33	C
478	Esano-miscela di isomeri contenente un massimo di 5% di n-Esano		110-54-3	601-007-00-7	F	11	9-16-23-29-33	C
(*) 479	2-Esanone		591-78-6	606-030-00-6	T	10-23/24-40	21-23-44	
480	Eserina		57-47-6	614-020-00-8	T	26/28	1-25-45	
481	Eserina sali			614-021-00-3	T	26/28	1-25-45	A
482	Etano		74-84-0	601-002-00-X	F	12	9-16-33	
	Etanolamina	n. 93						
483	Etanolo		64-17-5	603-002-00-5	F	11	7-16	
	Etantiolo	n. 511						
484	Etere diclorometilico		542-88-1	603-046-00-5	T	26-39	24/25-45	
485	Etere etilico		60-29-7	603-022-00-4	F	12-19	9-16-29-33	
486	Ethion		563-12-2	015-047-00-2	T	23/24/25	2-13-44	
487	Ethoxyquin			613-014-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
488	Etilamina		75-04-7	612-002-00-4	F-Xi	13-36/37	16-26-29	
	2-Etilamino-4-isopropilamino-6-metiltio-1,3,5-triazina	n. 84						
489	N-Etilanilina		103-69-5	612-053-00-2	T	23/24/25-33	28-37-44	
490	Etilati alcalini		16331-64-9	603-041-00-3	F-C	11-14-34	8-16-26-43	A
491	Etilbenzene		100-41-4	601-023-00-4	F-Xi	11-37	16-29	
492	2-Etilbutanolo		97-95-0	603-051-00-2	Xn	21/22		
	S-(N-Etil-carbamoil-metil)-O,O-dimetil-ditiofosfato	n. 515						
	Etil-cicloesil glicidil etere	n. 493						
(*) 493	1-(2-Etilcicloesilossi)-2,3-epossipropano			603-068-00-5	Xi	36/38-43	26-28-37/39	
	S-Etil-N-N-dipropil-tiocarbammato	n. 469						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
494	Etile acetato		141-78-6	607-022-00-5	F	11	16-23-29-33	
(**) 495	Etile acrilato		140-88-5	607-032-00-X	F-Xi	11-20/22-36/37/ 38-43	9-16-33	D
496	Etile bromoacetato			607-069-00-1	T	26/27/28	7/9-26-45	
	Etile bromuro	n. 176						
497	Etile cloroacetato			607-070-00-7	T	23/24/25	7/9-44	
498	Etile cloroformiato		541-41-3	607-020-00-4	F-T	11-23-36/37/38	9-16-33-44	
	Etile cloruro	n. 675						
	Etile-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-decacloro -4-idrossi-à5.2.1.0(2,6)0(3,9)0(5,8)ù-pentaciclo-dec-4-il)levulinato	n. 588						
499	Etile formiato		109-94-4	607-015-00-7	F	11	9-16-33	
500	Etile lattato		97-64-3	607-129-00-7		10	23	
(**) 501	Etile metacrilato		97-63-2	607-071-00-2	F-Xi	11-36/37/38-43	9-16-29-33	D
	N,N'-Etilen-bis(ditiocarbammato di sodio)	n. 686						
	Etilendiamina	n. 320						
	1,1-Etilen-2,2'-dipiridino	n. 437						
502	Etilene		74-85-1	601-010-00-3	F	13	9-16-33	
	Etilene bromuro	n. 329						
	Etilene dicloruro	n. 345						
503	Etilene ossido		75-21-8	603-023-00-X	F-T	13-26	9-16-33-45	
504	Etilenglicol dimetacrilato			607-114-00-5	Xi	36/37		D
	Etilenglicol dimetiletere	n. 411						
	Etilenglicol dinitrato	n. 705						
	Etilenglicol monobutiletere	n. 207						
	Etilenglicol monobutiletere acetato	n. 208						
	Etilenglicol monoetiletere	n. 517						
	Etilenglicol monoetiletere acetato	n. 518						
	Etilenglicol monoisopropiletere	n. 587						
	Etilenglicol monometiletere	n. 666						
	Etilenglicol monometiletere acetato	n. 667						
505	Etilenimina		151-56-4	613-001-00-1	F-T	11-26/27/28-40	9-29-36-45	D
506	Etile nitrato			007-007-00-8	E	2	23-24/25	
507	Etile nitrito		109-95-5	007-006-00-2	E-Xn	2-20/21/22		
508	Etile propionato		105-37-3	607-028-00-8	F	11	16-23-29-33	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS	N CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
509	2-Etilesile acrilato		103-11-7	607-107-00-7	Xi	37/38		D
(*) 510	Etile silicato		78-10-4	014-005-00-0	Xn	10-20-36/37		
	O-Etil-S-fenil-etil-ditiofosfonato	n. 539						
	Etilglicol	n. 517						
	Etilglicol acetato	n. 518						
	Etilidene cloruro	n. 345						
511	Etilmercaptano		75-08-1	016-022-00-9	F-Xn	11-20	16-25	
512	Etil-metil-etere		540-67-0	603-020-00-3	F	13	9-16-33	
	O-Etil-O-(4-nitro-fenil)-fenil-tiofosfonato	n. 455						
513	S-2-Etil-sulfinil-etil-O,O-dimetil-ditiofosfato			015-065-00-0	T	26/27/28	1-13-28-45	
514	S-2-Etil-sulfinil-isopropil-O,O-dimetil-monotiofosfato			015-075-00-5	T	23/24/25	2-13-44	
	S-(2-Etil-sulfonil-etil)-O,O-dimetiltiofosfato	n. 309						
	O-Etil-O-(2,4,5-triclorofenil)etiltiofosfonato	n. 885						
	Etino	n. 3						
515	Etoatometil		116-06-8	015-089-00-1	Xn	20/21/22	2-13	C
516	2-Etossianilina e 4-etossianilina		94-70-2 156-43-4	612-039-00-6	T	23/24/25-33	28-36/37-45	C
517	2-Etossietanolo		110-80-5	603-012-00-X	Xi	10-36	24	
518	2-Etossietil acetato		111-15-9	607-037-00-7	Xn	10-20/21	24	
	6-Etossi-2,2,4-trimetil-1,2-diidrochinolina	n. 487						
519	Fenaminosulf		140-56-7	611-003-00-7	T	23/24/25	2-13-44	
520	Fenazaflor			613-015-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
521	Fenclorfos		299-84-3	015-052-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
	o-Fenetidina e p-fenetidina	n. 516						
	Fenil-5,6-dicloro-2-trifluorometil-1-benzimidazolcarbossilato	n. 520						
(**) 522	Fenilendiamina		25265-76-3	612-028-00-6	T	23/24/25-43	28-44	C
523	m-Fenilendiamina dicloridrato e p-fenilendiamina dicloridrato		541-69-5 624-18-0	612-029-00-1	T	23/24/25	28-44	C
524	Fenilidrazina		100-63-0	612-023-00-9	T	23/24/25-36	28-44	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
525	1-Fenil-3-pirazolidone		92-43-3	606-022-00-2	Xn	22		
	S-(2-Fenilsolfonamido-etil)-0,0-diisopropil-ditiofosfato	n. 148						
526	Fenitrotion		122-14-5	015-054-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
527	Fenkapton		2275-14-1	015-037-00-8	T	23/24/25	2-13-44	
528	Fenolo		108-95-2	604-001-00-2	T	24/25-34	2-28-44	
529	Fenoprop		93-72-1	607-047-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
530	Fenoprop sali			607-048-00-7	Xn	20/21/22	2-13	A
531	Fenson		80-38-6	650-003-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
532	Fensulfothion		115-90-2	015-090-00-7	T	26/27/28	1-13-28-45	
533	Fentin acetato			050-003-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
534	Fentin idrossido			050-004-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
535	Fention		55-38-9	015-048-00-8	Xn	20/21/22-36/38	2-13	
536	Fentoato		2597-03-7	015-097-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
	Fisostigmina	n. 480						
537	Fluenetil			607-078-00-0	T	26/27/28	1-13-28-45	
538	Fluoro		7782-41-4	009-001-00-0	T	7-26-35	7/9-36-45	
	2-Fluoroetil-2-(4-bifenilil)-acetato	n. 537						
539	Fonofos		944-22-9	015-091-00-2	T	26/27/28	1-13-45	
540	Forate		298-02-2	015-033-00-6	T	26/27/28	1-13-28-45	
	Formaldeide conc.compresa tra 5% e 30%	n. 69						
	Formaldeide conc. sup. a 30%	n. 70						
	Formalina conc.sup. a 30%	n. 70						
541	Formetanato			006-031-00-6	T	26/27/28	1-13-45	
542	Formothion		2540-82-1	015-057-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
543	Fosalone			015-067-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
544	Fosfamidone		297-99-4	015-022-00-6	T	26/27/28	1-13-28-45	
545	Fosforo bianco			015-001-00-1	F-T	17-26/28-35	5-26-28-45	
	Fosforo giallo	n. 545						
546	Fosforo ossicloruro		10025-87-3	015-009-00-5	C	34-37	7/8-26	
547	Fosforo pentacloruro		10026-13-8	015-008-00-X	C	34-37	7/8-26	
548	Fosforo pentasolfuro		1314-80-3	015-104-00-1	F-Xn	11-20/22-29		
549	Fosforo rosso			015-002-00-7	F	11-16	7-43	
550	Fosforo tribromuro		7789-60-8	015-103-00-6	C	14-34-37	26	
551	Fosforo tricloruro		7719-12-2	015-007-00-4	C	34-37	7/8-26	
(**) 552	Fosforo trisolfuro		1314-85-8	015-012-00-1	F-Xn	11-22	7-16-24/25	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	Fosgene	n. 230						
553	Fosmet		732-11-6	015-101-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
554	Foxim			015-100-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
555	Fuberidazole			613-016-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
	Furfurolo	n. 71						
	2-(2'-Furil)-benzimidazolo	n. 555						
	Glicerina trinitrato	n. 704						
	Glicidile acrilato	n. 461						
	Glicidile metacrilato	n. 462						
556	Glicol etilenico		107-21-1	603-027-00-1	Xn	22	2	
557	Gliossale...%		107-22-2	605-016-00-7	Xi	36/38	26-28	B
	Glucocloral	n. 256						
558	HCH, BHC		608-73-1	602-042-00-0	T	23/24/25	2-13-44	C
	HEOD 85%	n. 366						
559	Idrazina		302-01-2	007-008-00-3	T	10-26/27/28-34-40	36/37/39-45	
560	Idrazina soluzione conc.compresa tra 5% e 64%			007-008-01-0	C	24/25-34-40	36/37/39	B
	Idrochinone	n. 383						
561	Idrogeno		1333-74-0	001-001-00-9	F	12	7/9	
562	Idrogeno perossido soluzione conc.compresa tra 20% e 60%			008-003-01-6	C	34	28-39	B
563	Idrogeno perossido soluzione conc. sup. a 60%		7722-84-1	008-003-00-9	O-C	8-34	3-28-36/39	B
564	Idrogeno solforato		7783-06-4	016-001-00-4	F-T	13-26	7/9-25-45	
565	8-Idrossichinolina solfato		134-31-6	613-017-00-9	Xn	20/21/22	2-13	
	1-Idrossicicloesile perossido	n. 167						
	4-Idrossi-3,5-diiodo-benzonitrile	n. 579						
566	2-Idrossietile acrilato		818-61-1	607-072-00-8	T	24-34-43	26-36/39-44	D
(**) 567	2-Idrossietile metacrilato		868-77-9	607-124-00-X	Xi	36/38-43	26-28	D
568	1-Idrossi-1-idroperossi-dicicloesile perossido			617-009-00-6	E-C	3-35	3/7/9-14-27-34-37/39	
569	4-Idrossi-4-metil-pentan-2-one		123-42-2	603-016-00-1	Xi	36	24/25	
	4-Idrossi-3-(3-osso-1-fenil-butil)-cumar	n. 925						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	4-Idrossi-3-à3-osso-1-(2-furil)butilù-cumarina	n. 293						
	5-àalfa-Idrossi-alfa-(2-piridil)-benzilù-7-àalfa-(2-piridil)-benzilidenù-norborn-5-en-2,3-dicarbossimide	n. 712						
570	Idrossipropile acrilato (miscela di isomeri)		999-61-1	607-108-00-2	T	23/24/25-34-43	26-36/39-44	D
571	Idrossipropile metacrilato (miscela di isomeri)			607-125-00-5	Xi	36/38	26-28	D
	4-Idrossi-3-(1,2,3,4-tetraidro-1-naftil)-cumarina	n. 295						
572	Iodio		7553-56-2	053-001-00-3	Xn	20/21	23-25	
573	Iodometano		74-88-4	602-005-00-9	T	23/24/25-34	26-44	
574	3-Iodopropene			602-054-00-6	C	10-34	7-26	
575	Iodossibenzene		696-33-3	053-003-00-4	E	1	35	
576	Iodossibenzoato di calcio			053-004-00-X	E	1	35	C
577	Iosciamina		101-31-5	614-012-00-4	T	26/28	1-24-45	
578	Iosciamina sali			614-013-00-X	T	26/28	1-24-45	A
579	Ioxinil		1689-83-4	608-007-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
	Ipoazotite e azoto tetrossido	n. 139						
580	Isobenzan		297-78-9	602-053-00-0	T	26/27/28-36/38	1-13-44	
	Isobutanolamina	n. 95						
(**) 581	Isobutile acrilato		106-63-8	607-115-00-0	Xn	10-20/21-38-43	9	D
(**) 582	Isobutile metacrilato		97-86-9	607-113-00-X	Xi	10-36/37/38-43		D
	4-Isocianatosulfonil-toluene	n. 870						
583	Isodrin		465-73-6	602-050-00-4	T	26/27/28	1-13-28-45	
	Isoforon diamina	n. 96						
(*) 584	Isoforon diisocianato		4098-71-9	615-008-00-5	T	23-36/37/38-42/43	26-28-38-45	
	Isoforone	n. 904						
585	Isolan		119-38-0	006-009-00-6	T	26/27/28	1-13-45	
	Isopentano e pentano	n. 736						
	Isoprene	n. 632						
586	Isopropenilbenzene		98-83-9	601-027-00-6	Xi	10-36/37		
	Isopropilamina	n. 97						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	2-Isopropilamino-4-metilamino-6-metiltio-1,3,5-triazina	n. 311						
	Isopropilbenzene e propilbenzene	n. 784						
	3-Isopropil-1H,3H,2,1,3-benzotiodiazin-4-one-2,2-diossido	n. 149						
	O-Isopropil-ditiocarbonato di sodio	n. 792						
	Isopropile acetato e propile acetato	n. 785						
	Isopropile formiato e propile formiato	n. 786						
	N-Isopropil-N-fenil-2-cloroacetamide	n. 777						
	Isopropilglicol	n. 587						
	3-Isopropil-5-metil-fenile-N-metilcarbammato	n. 776						
	(1-Isopropil-3-metil-1H-pirazol-5-il)-N,N-dimetil-carbammato	n. 585						
(**) 587	2-Isopropossi-etanolo		109-59-1	603-013-00-5	Xn	20/21-36	24/25	
	2-Isopropossi-fenil-N-metil-carbammato	n. 790						
588	Kelevan			607-079-00-6	Xn	20/21/22	2-13	
589	Leptophos			015-093-00-3	T	23/24/25-39	2-13-44	
590	Lindano		58-89-9	602-043-00-6	T	23/24/25-36/38	2-13-44	
591	Linuron			006-021-00-1	Xi	38	2-13	
592	Litio			003-001-00-4	F-C	14/15-34	8-43	
593	Litio-alluminio idruro		16853-85-3	001-002-00-4	F	15	7/8-24/25-43	
594	Magnesio alchili			012-003-00-4	F-C	14-17-34	16-43	A
595	Magnesio fosfuro		12057-74-8	015-005-00-3	F-T	15/29-28	1/2-22-43-45	
596	Magnesio in polvere (piroforica)		7439-95-4	012-001-00-3	F	15-17	7/8-43	
597	Magnesio in polvere (stabilizzata) o trucioli			012-002-00-9	F	11-15	7/8-43	
598	Malation		121-75-5	015-041-00-X	Xn	20/21/22	2-13	
599	Malononitrile		109-77-3	608-009-00-7	T	23/24/25	23-27	
600	Manganese biossido		1313-13-9	025-001-00-3	Xn	20/22	25	
601	Mannitol-esanitrato		130-39-2	603-036-00-0	E	3	35	
602	MCPA			607-051-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
603	MCPA sali ed esteri			607-052-00-9	Xn	20/21/22	2-13	A
604	MCPB		94-81-5	607-053-00-4	Xn	20/21/22	2-13	
605	MCPB sali ed esteri			607-054-00-X	Xn	20/21/22	2-13	A
	MDI	n. 381						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
606	Mecarbam		2595-54-2	015-045-00-1	T	23/24/25	2-13-44	
607	Mecoprop·			607-049-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
608	Mecoprop sali			607-050-00-8	Xn	20/21/22	2-13	A
609	Menazone		78-57-9	015-053-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
610	p-Menta-1,8(9)-diene		138-86-3	601-029-00-7	Xi	10-38	28	
611	8-p-Mentanile idroperossido			617-012-00-2	O-C	11-35	3/7/9-14-27-37/39	
	p-Mentano idroperossido	n. 611						
612	Mephosfolan			015-094-00-9	T	26/27/28	1-13-28-45	
613	Mercurio		7439-97-6	080-001-00-0	T	23-33	7-44	
(*) 614	Mercurio alchili			080-007-00-3	T	26/27/28-33	2-13-28-36-45	A
615	Mercurio cloruro oso		10112-91-1	080-003-00-1	Xn	22	2	
616	Mercurio composti inorganici escluso il solfuro di mercurio (cinabro) e quelli espressamente indicati in questo allegato			080-002-00-6	T	26/27/28-33	1/2-13-28-45	A
617	Mercurio composti organici, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			080-004-00-7	T	26/27/28-33	2-13-28-36-45	A
618	Mercurio fulminato		20820-45-5	080-005-00-2	E-T	23/24/25-33	3-34-35-44	
619	Mercurio ossicianuro		1335-31-5	080-006-00-8	E-T	23/24/25-33	28-35-44	
620	Mesitilene		108-67-8	601-025-00-5	Xi	10-37		
	Mesitile ossido	n. 656						
621	Metacrilati, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			607-134-00-4	Xi	36/37/38	26-28	
(**) 622	Metacrilonitrile		126-98-7	608-010-00-2	F-T	11-23/24/25-43	9-16-18-29-45	D
623	Metaldeide		108-62-3	605-005-00-7	Xn	10-20/22	2-24/25	
	Metallile cloruro	n. 275						
624	Metamidophos			015-095-00-4	T	26/27/28	1-13-28-45	
625	Metam-sodio		137-42-8	006-013-00-8	Xn	22-38	2-13	
626	Metano		74-82-8	601-001-00-4	F	12	9-16-33	
627	Metanolo		67-56-1	603-001-00-X	F-T	11-23/25	2-7-16-24	
	Metantiolo	n. 651						
628	Metidation		950-37-8	015-069-00-2	T	26/27/28	1-13-45	
629	Metilamina (mono, di e tri)		74-89-5 124-40-3 75-50-3	612-001-00-9	F-Xi	13-36/37	16-26-29	C

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
630	N-Metilanilina		100-61-8	612-015-00-5	T	23/24/25-33	28-37-44	
631	Metilati alcalini		3315-60-4	603-040-00-2	F-C	11-14-34	8-16-26-43	A
	O-Metil-O-(4-bromo-2,5-diclorofenil)-fenil-tiofosfonato	n. 589						
632	2-Metilbutan-1,3-diene		78-79-5	601-014-00-5	F	12	9-16-29-33	D
	Metilbutano	n. 736						
633	2-Metilbutan-2-olo		75-85-4	603-007-00-2	F-Xn	11-20	9-16-24/25	
634	3-Metil-2-butanone		563-80-4	606-007-00-0	F	11	9-16-33	
	Metilbutilchetone	n. 479						
	6-(1-Metilbutil)-2,4-dinitrofenolo	n. 425						
635	Metilcicloesano		108-87-2	601-018-00-7	F	11	9-16-33	
636	2-Metilcicloesanolo		583-59-5	603-010-00-9	Xn	20	24/25	
637	2-Metilcicloesanone		583-60-8	606-011-00-2	Xn	10-20	25	
	Metilcloroformio	n. 880						
	N-Metil-ditiocarbammato di sodio	n. 625						
638	Metile acetato		79-20-9	607-021-00-X	F	11	16-23-29-33	
639	Metile acrilato		96-33-3	607-034-00-0	F-Xi	11-20/22-36/37/38	9-16-33	D
640	Metile bromuro		74-83-9	602-002-00-3	T	26	1/2-7/9-24/25-27-45	
	Metile-2-cloro-3-p-clorofenil-propionato	n. 236						
641	Metile cloroformiato		79-22-1	607-019-00-9	F-T	11-23-36/37/38	9-16-33-44	
642	Metile cloruro		74-87-3	602-001-00-7	F-Xn	13-20	9-16-33	
643	Metile formiato		107-31-3	607-014-00-1	F	12	9-16-33	
	Metile ioduro	n. 573						
644	Metile isocianato		624-83-9	615-001-00-7	F-T	12-23/24/25-36/37/38	9-30-43-44	
645	Metile lattato		547-64-8	607-092-00-7		10	23	
	Metilen-S,S'-bis(O,O-dietil-ditiofosfato)	n. 486						
	3,3'-Metilen-bis(4-idrossi-cumarina)	n. 364						
646	2,2'-Metilen-bis-(3,4,6-triclorofenolo)		70-30-4	604-015-00-9	T	24/25	20-37-44	
	Metilene bromuro	n. 330						
	Metilene cloruro	n. 352						
	Metile ossido	n. 401						
647	Metile propionato		554-12-1	607-027-00-2	F	11	16-23-29-33	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
648	5-Metil-3-eptanone		541-85-5	606-020-00-1	Xi	10-36/37	23	
649	5-Metil-2-esanone		110-12-3	606-026-00-4		10	23	
	Metiletilchetone	n. 189						
	Metilglicol	n. 666						
	Metilglicol acetato	n. 667						
	Metilisobutilcarbinolo	n. 654						
	Metilisobutilchetone	n. 655						
	Metilisopropilchetone	n. 634						
650	Metilisotiocianato		556-61-6	615-002-00-2	Xn	10-20/22	24/25	
651	Metilmercaptano		74-93-1	016-021-00-3	F-Xn	13-20	16-25	
(**) 652	Metilmetacrilato		80-62-6	607-035-00-6	F-Xi	11-36/37/38-43	9-16-29-33	D
	N-Metil-1-naftil-carbammato	n. 227						
	7-(N-Metil-ossicarbamoil)-2-metil-2,3-diidrobenzofurano	n. 305						
653	2-Metil-2,4-pentandiolo		107-41-5	605-053-00-3	Xi	36/38		
654	4-Metilpentan-2-olo		108-11-2	603-008-00-8	Xi	10-37	24/25	
655	4-Metil-pentan-2-one		108-10-1	606-004-00-4	F	11	9-16-23-33	
656	4-Metilpent-3-en-2-one		141-79-7	606-009-00-1	Xn	10-20/21/22	25	
657	N-Metil-2-pirrolidone		872-50-4	606-021-00-7	Xi	36/38	41	
658	2-Metilpropan-2-olo		75-65-0	603-005-00-1	F-Xn	11-20	9-16	
	2-Metil-2-propene nitrile	n. 622						
	à6-(1-Metil-propil)-2,4-dinitro-fenilù-3,3-dimetil-acrilato	n. 161						
	6-(1-Metilpropil)-2,4-dinitrofenolo	n. 427						
	alfa-Metilstirene	n. 586						
659	o-Metilstirene		611-15-4	601-028-00-1	Xn	20	24	
660	N-Metil-N-2,4,6-tetranitroanilina		479-45-8	612-017-00-6	E-T	2-23/24/25-33	35-44	
	2-Metil-2-tiometil-propionaldeid-O-(N-metil-carbamoil)-ossima	n. 72						
661	N-Metiltoluidina			612-055-00-3	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
662	Metiltriclorosilano		75-79-6	014-004-00-5	F-Xi	11-14-36/37/38	26-39	
663	Metil-vinil-etere		107-25-5	603-021-00-9	F	13	9-16-33	D
664	Metiocarb			006-023-00-2	T	23/24/25	2-13-44	
665	2-Metossi-anilina e 4-metossi-anilina		90-04-0 104-94-9	612-035-00-4	T	26/27/28-33	28-36/37-45	C

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	(2-Metossicarbonil-1-metil-vinil)dimetil-fosfato-	n. 672						
(**) 666	2-Metossietanolo		109-86-4	603-011-00-4	Xn	10-20/21/22-37	24/25	
667	2-Metossietil-acetato		110-49-6	607-036-00-1	Xn	10-20/21	24	
	S-(N-(2-Metossietil)-carbamoil-metil)-O,O-dimetil-ditiofosfato	n. 85						
668	4-Metossi-4-metil-2-pentanone		107-70-0	606-023-00-8		10	23	
669	4-Metossi-2-nitroanilina		96-96-8	612-038-00-0	T	26/27/28-33	28-36/37-45	
	S-à(5-Metossi-4H-piron-2-il)-metilù-O,O-dimetil-tiofosfato	n. 453						
(*) 670	1-Metossi-2-propanolo		107-98-2	603-064-00-3		10	24	
671	Metoxuron		19937-59-8	006-033-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
672	Mevinfos		298-01-1	015-020-00-5	T	26/27/28	1-13-28-45	
673	Mipafox		371-86-8	015-062-00-4	T	26/27/28-39	1-13-45	
	Monobromometano	n. 640						
674	Monoclorobenzene		108-90-7	602-033-00-1	Xn	10-20	24/25	
675	Monocloroetano		75-00-3	602-009-00-0	F	13	9-16-33	
	Monoclorometano	n. 642						
676	Monocloropentano		2965-63-1	602-022-00-1	F-Xn	11-20/21/22	9-29	C
677	Monocloropropano		540-54-5	602-018-00-X	F-Xn	11-20/21-22	9-29	C
678	Monoclorotoluene		95-49-8 108-41-8 106-43-4	602-040-00-X	Xn	20	24/25	C
679	Monocrotophos		6923-22-4	015-072-00-9	T	26/27/28	1-13-28-45	
680	Monofluoroacetamide		640-19-7	616-002-00-5	T	26/27/28	1/2-20-22-26-45	
681	Monofluoroacetati solubili			607-082-00-2	T	28	1/2-20-22-26-45	A
682	Monolinuron			006-032-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
683	Morfamquat ed i suoi sali			613-018-00-4	Xn	20/21/22	2-13	A
684	Morfolina		110-91-8	613-028-00-9	C	10-20/21/22-34	23-26	
685	Morphotion		144-41-2	015-058-00-2	T	23/24/25	2-13-44	
686	Nabam		142-59-6	006-014-00-3	Xn	22-38	2-13	
687	2-Naftilamina		91-59-9	612-022-00-3	T	26/27/28-39	22-27-36-45	
688	1-Naftilamina (contenente 1% e piu' di 2-naftilamina)		134-32-7	612-021-00-8	T	26/27/28-39	22-27-36-45	
689	1-Naftilamina (contenente meno di 1% di 2-naftilamina)		134-32-7	612-020-00-2	Xn	20/21/22-33	22-36	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
(*) 690	Naftilen-1,5-diisocianato		3173-72-6	615-007-00-X	Xn	20-36/37/38-42	26-28-38-45	
	2-(1-Naftil)-indan-1,3-dione	n. 691						
691	Naftilindandione			606-015-00-4	T	25	2-13-44	
	1-Naftiltiourea	n. 125						
692	2-Naftolo		135-19-3	604-007-00-5	Xn	20/22	24/25	
693	Naled		300-76-5	015-055-00-6	Xn	20/21/22-36/37	2-13	
	Neopentano	n. 406						
694	Nichel carbonile		13463-39-3	028-001-00-1	F-T	11-26-40	9-23-45	
695	Nicotina		54-11-5	614-001-00-4	T	26/27/28	1-13-28-45	
696	Nicotina sali			614-002-00-X	T	26/27/28	1-13-28-45	A
697	Nitrile acrilato		107-13-1	608-003-00-4	F-T	11-23/24/25	9-16-27-29-44	D
	Nitrile butirrico	n. 205						
698	Nitroanilina		99-09-2 88-74-4 100-01-6	612-012-00-9	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
	2-Nitro-p-anisidina	n. 669						
699	Nitrobenzene		98-95-3	609-003-00-7	T	26/27/28-33	28-36/37-45	
(*) 700	Nitrocellulosa (contenente non piu' del 12,6% d'azoto)			603-037-01-8	F	11	16-33-37/39	
(**) 701	Nitrocellulosa (contenente piu' del 12,6 % d'azoto)		9004-70-0	603-037-00-6	E	1-3	35	
702	Nitroetano		79-24-3	609-035-00-1	Xn	10-20/22	9-25-41	
703	4-Nitrofenolo		100-02-7	609-015-00-2	Xn	20/21/22-33	28	
704	Nitroglicerina		55-63-0	603-034-00-X	E-T	3-26/27/28-33	33-35-36/37-45	
705	Nitroglicol		628-96-6	603-032-00-9	E-T	2-26/27/28-33	33-35-36/37-45	
	Nitromannite	n. 601						
706	Nitrometano		75-52-5	609-036-00-7	Xn	5-10-22	41	
707	1-Nitropropano		108-03-2	609-001-00-6	Xn	10-20/21/22	9	
708	2-Nitropropano		79-46-9	609-002-00-1	Xn	10-20/21/22	9	
709	4-Nitrosoanilina		659-49-4	612-011-00-3	Xn	20/21/22	25-28	
710	2-Nitrotoluene e 4-nitrotoluene		88-72-2 99-99-0	609 006-00-3	T	23/24/25-33	28-37-44	C
711	Nitrotoluidina		28676-13-3	612-025-00-X	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
712	Norbormide		991-42-4	650-004-00-7	T	23/24/25	2-13-44	
(**) 713	2-Norbornile acrilato		10027-06-2	607-121-00-3	Xn	21-38-43	28	D

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
(**) 714	Oleum (conc. SO3 compresa tra 20% e 65%)			016-019-00-2	C	14-35-37	26-30	B
715	Ometoato			015-066-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
716	Osmio tetrossido		20816-12-0	076-001-00-5	T	26/27/28-34	7/9-26-45	
717	Ossidemeton metile		301-12-2	015-046-00-7	T	23/24/25	2-13-44	
718	Ossigeno liquido		7782-44-7	008-001-00-8	O	8-34	21	
	Ossirano	n. 503						
	1,3,4,5,6,7,8,8-Ottacloro-1,3,3a,4,7,7a-esaidro-4,7-endo-metan-isobenzofurano	n. 580						
	1,2,4,5,6,7,8,8-Ottacloro-3a-4,7,7a-tetraidro-4,7-endo-metano-indano	n. 258						
	Ottametil-difosforamide	n. 794						
719	Ottano		111-65-9	601-009-00-8	F	11	9-16-29-33	
	4-Ottil-2,6-dinitrofenile crotonato e 6-ottil-2,4-dinitrofenile crotonato miscela di isomeri	n. 423						
	4-Ottil-2,6-dinitrofenile metilcarbonato e 6-ottil-2,4-dinitrofenile metilcarbonato miscela di isomeri	n. 424						
720	Oubaina		36-06-6	614-025-00-5	T	23/25-33	44	
721	Oxidisulfoton		2497-07-6	015-096-00-X	T	26/27/28	1-13-45	
722	Papaverina		58-74-2	614-018-00-7	Xn	22	22	
723	Papaverina sali			614-019-00-2	Xn	22	22	A
724	Paraldeide		123-63-7	605-004-00-1	F	11	9-16-29-33	
725	Paraquat e suoi sali		1910-42-5	613-006-00-9	T	26/27/28	1-13-45	A
726	Paration		56-38-2	015-034-00-1	T	26/27/28	1-13-28-45	
727	Paration-metile		298-00-0	015-035-00-7	T	26/27/28	1-13-28-45	
	PCB	n. 759						
728	Pebulate		1114-71-2	006-034-00-2	Xn	20/21/22	2-13	
729	Pentacloroetano		76-01-7	602-017-00-4	T	26/27	1-38-45	
730	Pentaclorofenolo		87-86-5	604-002-00-8	T	23/24/25	28-36/39-44	
731	Pentaclorofenolo sali alcalini			604-003-00-3	T	23/24/25	28-36/39-44	A
732	Pentacloronaftalina			602-041-00-5	Xn	21/22-36/38	35	C
733	Pentaeritritol tetraacrilato			607-122-00-9	Xi	36/38-43	26-39	D
734	Pentaeritritol triacrilato		3524-68-3	607-110-00-3	Xi	36/38-43	39	D
	Pentaetilenesamina	n. 845						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
(*) 735	2,4-Pentandione		123-54-6	606-029-00-0	Xn	10-22	21-23-24/25	
736	Pentano ed isopentano		109-66-0 78-78-4	601-006-00-1	F	11	9-16-29-33	
737	3-Pentanone		96-22-0	606-006-00-5	F	11	9-16-33	
	Pentrite	n. 859						
	Percloroetilene	n. 848						
	Perfluoropropene	n. 471						
738	Phosazetim		4104-14-7	015-092-00-8	T	26/27/28	1-13-28-45	
739	Phosniclor			015-043-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
740	Picrati			609-010-00-5	E-T	3-23/24/25	28-35-37-44	A
741	Pilocarpina		92-13-7	614-016-00-6	T	26/28	1-25-45	
742	Pilocarpina sali			614-017-00-1	T	26/28	1-25-45	A
743	2-Pinanile idroperossido			617-005-00-4	O-C	11-35	3/7/9-14-27-37/39	
	Pinano idroperossido	n. 743						
744	Pindone		83-26-1	606-016-00-X	T	25	2-13-44	
745	Piombo alchili			082-002-00-1	T	26/27-28-33	13-26-36/37-45	A
746	Piombo azoturo		13424-46-9	082-003-00-7	E-Xn	3-20/22-33	33-34-35	
747	Piombo composti, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			082-001-00-6	Xn	20/22-33	13-20/21	A
748	Piombo esafluosilicato		1310-03-8	009-014-00-1	Xn	20/22-33	13-20/21-24-25	
749	Piombo 2,4,6-trinitroresorcinato		17994-50-6	609-019-00-4	E-Xn	3-20/22-33	33-34-35	
750	Piperazina		110-85-0	612-057-00-4	C	34	26-36	
751	Piperidina		110-89-4	613-027-00-3	F-T	11-23/24-34	16-26-27-44	
752	Pirazoxon		108-34-9	015-023-00-1	T	26/27/28	1-13-28-45	
753	Piretrina I		121-21-1	613-023-00-1	Xn	20/21/22	2-13	
754	Piretrina II		121-29-9	613-024-00-7	Xn	20/21/22	2-13	
755	Piretrine, comprese le cinerine			613-022-00-6	Xn	20/21/22	2-13	
756	Piridina		110-86-1	613-002-00-7	F-Xn	11-20/21/22	26-28	
757	Pirimicarb		23103-98-2	006-035-00-8	T	23/24/25	2-13-44	
758	Pirimifos-etile		5221-49-8	015-099-00-6	T	23/24/25	2-13-44	
	Pirogallolo	n. 903						
759	Policlorodifenil			602-039-00-4	Xn	33	35	C
(*) 760	Polietilenamina			612-065-00-8	C	21/22-34-43	26-36/37/39	
	Potassa caustica	n. 768						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	Potassa caustica soluzione conc.compresa tra 1% e 5%	n. 769						
	Potassa caustica soluzione conc. sup. a 5%	n. 770						
761	Potassio		7440-09-7	019-001-00-2	F-C	14/15-34	5-8-43	
(**) 762	Potassio bicromato		7778-50-9	024-002-00-6	Xi	36/37/38-43	22-28	
763	Potassio bifluoruro		7789-29-9	009-008-00-9	C	25-34	22-26-37	
764	Potassio bromato		7758-01-2	035-003-00-6	O	9	24/25-27	
765	Potassio clorato			017-004-00-3	O-Xn	9-20/22	2-13-16-27	
(**) 766	Potassio cromato		7789-00-6	024-006-00-8	Xi	36/37/38-43	22-28	
767	Potassio fluoruro		7789-23-3	009-005-00-2	T	23/24/25	1/2-26-44	
768	Potassio idrossido		1310-58-3	019-002-00-8	C	35	2-26-37/39	
769	Potassio idrossido soluzione conc.compresa tra 1% e 5%			019-002-02-2	Xi	36/38	2-26	B
770	Potassio idrossido soluzione conc. sup. a 5%			019-002-01-5	C	35	2-26-27-37/39	B
771	Potassio nitrito		7758-09-0	007-011-00-X	O-T	8-25	44	
772	Potassio perclorato		7778-74-7	017-008-00-5	O-Xn	9-22	2-13-22-27	
773	Potassio permanganato		7722-64-7	025-002-00-9	O-Xn	8-22	2	
774	Potassio polisolfuri			016-007-00-7	C	31-34	26	
775	Potassio solfuro		1312-73-8	016-006-00-1	C	31-34	26	
776	Promecarb			006-037-00-9	T	23/24/25	2-13-44	
777	Propaclor		1918-16-7	616-008-00-8	Xn	20/21/22-36	2-13	
778	Propanale		123-38-6	605-018-00-8	F-Xi	11-36/37/38	9-16-29	
779	Propanil			616-009-00-3	Xn	20/21/22	2-13	
780	Propano		74-98-6	601-003-00-5	F	13	9-16-33	
781	1-Propanolo e 2-propanolo		71-23-8 67-63-0	603-003-00-0	F	11	7-16	C
782	2-Propenale		107-02-8	605-008-00-3	F-T	11-23-36/37/38	29-33-44	D
783	2-Propen-1-olo		107-18-6	603-015-00-6	F-T	11-26-36/37/38	16-39-45	
784	Propilbenzene ed isopropilbenzene		98-82-8	601-024-00-X	Xi	10-37		
	S-Propil-N-butil-N-etiltiocarbammato	n. 728						
785	Propile acetato ed isopropile acetato		109-60-4 108-21-4	607-024-00-6	F	11	16-23-29-33	C

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	Propile bromuro	n. 179						
	Propile cloruro	n. 677*						
786	Propile formiato ed isopropile formiato		625-55-8 110-74-7	607-016-00-2	F	11	9-16-33	C
787	Propilene		115-07-1	601-011-00-9	F	13	9-16-33	
	Propilene ossido	n. 458						
788	n-Propile propionato		106-36-5	607-030-00-9		10		
789	Propionile cloruro		79-03-8	607-093-00-2	F-C	11-14-34	9-16-26	
790	Propoxur		114-26-1	006-016-00-4	T	23/24/25	2-13-44	
791	Protoato		2275-18-5	015-032-00-0	T	26/27/28	1-13-45	
792	Proxan-sodio			006-024-00-8	Xn	22-38	2-13	
	Resine epossidiche (peso molecolare medio inf. o uguale a 700)	n. 166						
	Resorcina	n. 383						
793	Rotenone		83-79-4	650-005-00-2	T	23/24/25	2-13-44	
794	Schradan		152-16-9	015-026-00-8	T	26/27/28	1-13-28-45	
795	Scopolamina		51-34-3	614-014-00-5	T	26/27/28	1-25-45	
796	Scopolamina sali			614-015-00-0	T	26/27/28	1-25-45	A
797	Selenio			034-001-00-2	T	23/25-33	20/21-28-44	
798	Selenio composti tranne il solfoseleniuro di cadmio			034-002-00-8	T	23/25-33	20/21-28-44	A
799	Silicio tetracloruro		10026-04-7	014-002-00-4	Xi	14-36/37/38	7/8-26	
	Soda caustica anidra	n. 807						
	Soda caustica soluzione conc.compresa tra 1% e 5%	n. 808						
	Soda caustica soluzione conc. sup. a 5%	n. 809						
800	Sodio		7440-23-5	011-001-00-0	F-C	14/15-34	5-8-43	
801	Sodio azoturo		26628-22-8	011-004-00-7	T	28-32	28	
(**) 802	Sodio bicromato		10588-01-9	024-004-00-7	Xi	36/37/38-43	22-28	
803	Sodio bifluoruro			009-007-00-3	C	25-34	22-26-37	
804	Sodio clorato		7775-09-9	017-005-00-9	O-Xn	9-20/22	2-13-16-27	
805	Sodio fluoruro		7681-49-4	009-004-00-7	T	23/24/25	1/2-26-44	
806	Sodio idrosolfito		7775-14-6	016-028-00-1	Xn	7-22-31	7/8-26-28-43	
807	Sodio idrossido anidro		1310-73-2	011-002-00-6	C	35	2-26-37/39	
808	Sodio idrossido soluzione conc.compresa tra 1% e 5%			011-002-02-0	Xi	36/38	2-26	B

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
809	Sodio idrossido soluzione conc. sup. a 5%			011-002-01-3	C	35	2-26-27-37/39	B
810	Sodio idruro		7646-69-7	001-003-00-X	F	15	7/8-24/25-43	
811	Sodio ipoclorito soluzione conc. CL attivo sup. a 10%			017-011-00-1	C	31-34	2-28	B
812	Sodio ipoclorito soluzione conc. CL attivo compresa tra 5% e 10%			017-011-01-9	Xi	31-36/38	2-25	B
813	Sodio nitrito		7632-00-0	007-010-00-4	O-T	8-25	44	
814	Sodio perclorato		7601-89-0	017-010-00-6	O-Xn	9-22	2-13-22-27	
815	Sodio perossido		1313-60-6	011-003-00-1	O-C	8-35	8-27-39	
816	Sodio polisolfuri			016-010-00-3	C	31-34	26	
817	Sodio solfuro		1313-82-2	016-009-00-8	C	31-34	26	
818	Solfonitrica miscela con conc. HNO3 sup. a 30%			007-005-00-7	O-C	8-35	23-26-30-36	B
819	Solforile cloruro		7791-25-5	016-016-00-6	C	14-34-37	26	
820	Stagno tetracloruro		7646-78-8	050-001-00-5	C	34-37	7/8-26	
(*) 821	Stagno tributile, composti, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-008-00-3	T	23/24/25	26-27-28-44	A
(*) 822	Stagno tributile linoleato			050-015-00-1	Xn	20/21/22	26-28	
(*) 823	Stagno tributile naftenato			050-016-00-7	Xn	20/21/22	26-28	
(*) 824	Stagno tributile oleato			050-014-00-6	Xn	20/21/22	26-28	
(*) 825	Stagno tricicloesile, composti, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-012-00-5	Xn	20/21/22	26-28	A
(*) 826	Stagno triesile, composti, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-010-00-4	Xn	20/21/22	26-28	A
(*) 827	Stagno trietile, composti, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-006-00-2	T	26/27/28	26-27-28-45	A
	Stagno trifenile acetato	n. 533						
(*) 828	Stagno trifenile, composti, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-011-00-X	T	23/24/25	26-27-28-44	A
	Stagno trifenile idrossido	n. 534						

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
(*) 829	Stagno trimetile,composti,eslusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-005-00-7	T	26/27/28	26-27-28-45	A
(*) 830	Stagno triottile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-013-00-0	Xi	36/37/38		A
(*) 831	Stagno tripentile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-009-00-9	Xn	20/21/22	26-28	A
(*) 832	Stagno tripropile,composti,esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato			050-007-00-8	T	23/24/25	26-27-28-44	A
833	Stirene		100-42-5	601-026-00-0	Xi	10-36/37		D
834	Stricnina		57-24-9	614-003-00-5	T	26/28	1-13-45	
835	Stricnina sali			614-004-00-0	T	26/28	1-13-28-45	A
836	Strofantina-K			614-026-00-0	T	23/25-33	44	
837	Sulfallate		95-06-7	006-038-00-4	Xn	20/22-36/38	2-13	
838	Sulfotep		3689-24-5	015-027-00-3	T	26/27/28	1-13-28-45	
839	2,4,5-T		93-76-5	607-041-00-9	Xn	20/21/22-40	2-13	
840	Tallio		7440-28-0	081-001-00-3	T	26/28-33	2-13-28-45	
841	Tallio composti			081-002-00-9	T	26/28-33	2-13-28-45	A
842	TCA		650-51-1	607-005-00-2	Xn	22	24/25	
	TDI	n. 866						
843	TEPP		107-49-3	015-025-00-2	T	26/27/28	1-13-28-45	
844	2,4,5-T esteri e sali			607-042-00-4	Xn	20/21/22-40	2-13	A
(*) 845	3,6,9,12-Tetraazatetradecano-1,14-diamina		4067-16-7	612-064-00-2	C	34-43	26-36/37/39	
846	1,1,2,2-Tetrabromoetano		79-27-6	602-016-00-9	T	26-36	1-24-27-45	
847	1,1,2,2-Tetracloroetano		79-34-5	602-015-00-3	T	26/27	2-38-45	
848	Tetracloroetilene		127-18-4	602-028-00-4	Xn	20/22	2-25	
849	2,3,4,6-Tetraclorofenolo		58-90-2	604-013-00-8	T	25-36/38	26-28-37-44	
850	Tetraclorometano		56-23-5	602-008-00-5	T	26/27	2-38-45	
(*) 851	2,3,5,6-Tetracloro-4-(metilsulfonil)piridina			613-032-00-0	Xn	21/22-36-43	26/28	
	0,0,0,0-Tetraetil-ditio-pirofosfato	n. 838						
	Tetraetilenepentamina	n. 875						

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	Tetraetil-pirofosfato	n. 843						
852	Tetraidrofurano		109-99-9	603-025-00-0	F-Xi	11-19-36/37	16-29-33	
(*) 853	Tetraidro-2-furilmetanolo		97-99-4	603-061-00-7	Xi	36	39	
854	1,2,3,4-Tetraidro-1-naftile-idroperossido			617-004-00-9	O-C	11-35	3/7/9-14-27-37/39	
(*) 855	Tetraidrotiofene 1,1-diossido		126-33-0	016-031-00-8	Xn	22	25	
	Tetralina idroperossido	n. 854						
856	N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamina		100-22-1	612-032-00-8	Xn	20/21/22		
	N,N,N',N'-Tetrametil-fosforodiamido-fluoruro	n. 386						
	Tetrametiltiourame disolfuro	n. 864						
857	1,2,3,4-Tetranitrocarbazolo		28483-24-9	613-003-00-2	E-Xn	1-20/21/22	35	
858	Tetranitronaftalina			609-014-00-7	E-Xn	2-20/21/22-33	35	C
859	Tetranitropentaeritrite		78-11-5	603-035-00-5	E	3	35	
860	O,O,O,O-Tetrapropile ditiopirofosfato		3244-90-4	015-081-00-8	Xn	20/21/22	2-13	
	Tetrile	n. 660						
861	Thioquinox		93-75-4	613-019-00-X	Xn	20/22	2-13-24	
862	Tiometon		640-15-3	015-050-00-9	T	23/24/25	2-13-44	
863	Tionile cloruro		7719-09-7	016-015-00-0	C	14-34-37	26	
864	Tiram		137-26-8	006-005-00-4	Xn	22-38	2-13	
865	Titanio tetracloruro		7550-45-0	022-001-00-5	C	14-34/36/37	7/8-26	
	TNT	n. 914						
	2-Tolidina	n. 393						
	p-Toluen-N-clorosulfamide sale sodico	n. 257						
(**) 866	2,4-Toluen-diisocianato (1)		584-84-9	615-006-00-4	T	26-36/37/38-42	26-28-38-45	C
	2,6-Toluen-diisocianato (2)		91-08-7					
	Miscele di (1) e (2)							
867	Toluene		108-88-3	601-021-00-3	F-Xn	11-20	16-29-33	
868	Toluidina		26915-12-8	612-024-00-4	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
869	m-Toluilendiamina solfato e p-toluilendiamina solfato		6369-59-1	612-030-00-7	Xn	20/21/22	28	C
(*) 870	Tosilisocianato		4083-64-1	615-012-00-7	Xi	14-36/37/38-42	26-28-30	
	Toxafene	n. 404						
871	Trementina olio		8006-64-2	650-002-00-6	Xn	10-20/21/22	2	
872	Triallate		2303-17-5	006-039-00-X	Xn	20/22	2-13	
873	Triamifos		1031-47-6	015-024-00-7	T	26/27/28	1-13-45	

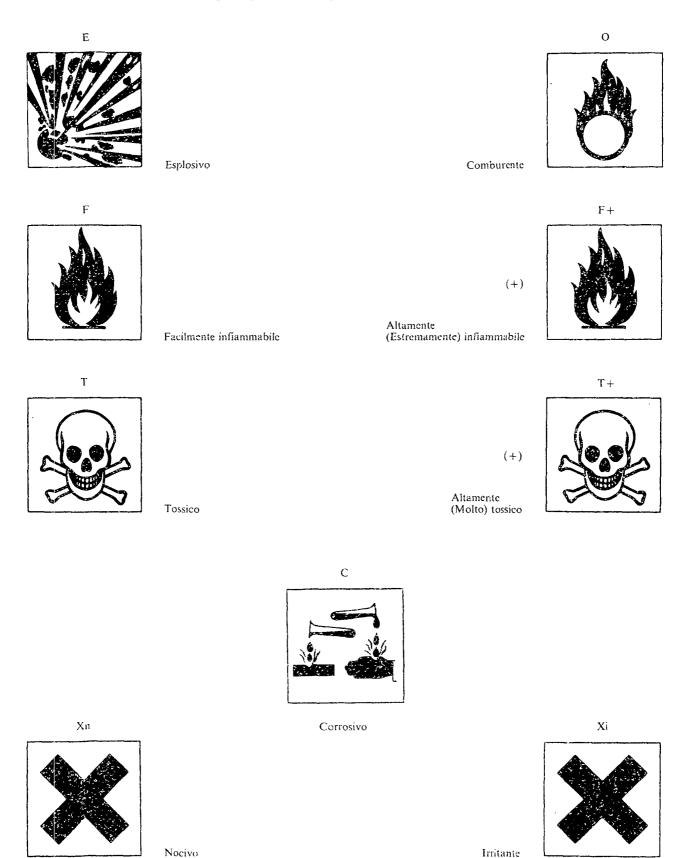
Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
874	Triarimol			603-043-00-9	Xn	20/22	2-13	
(*) 875	3,6,9-Triazaundecan-1,11-diamino		112-57-2	612-060-00-0	C	21/22-34-43	26-36/37/39	
876	Tribromometano		75-25-2	602-007-00-X	T	23-36/38	28-44	
	Tributil-(2,4-diclorobenzil)-fosfonio	n. 237						
877	Tributilfosfato		126-73-8	015-014-00-2	Xn	22	25	
	Tricicloesilstagno idrossido	n. 252						
878	Triclorfon		52-68-6	015-021-00-0	Xn	20/21/22	2-13	
	Tricloroacetato sale sodico	n. 842						
879	Tricloroacetonitrile		545-06-2	608-002-00-9	T	23/24/25	44	
	S-(2,3,3-Tricloro-allil)-diisopropil-tiocarbammato	n. 872						
	1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-cloro-fenil)-etano	n. 304						
	2,2,2-Tricloro-1,1-bis(4-cloro-fenil)-etanolo	n. 362						
880	1,1,1-Tricloroetano		71-55-6	602-013-00-2	Xn	20/22	2-25	
881	1,1,2-Tricloroetano		79-00-5	602-014-00-8	Xn	20/21/22	9	
882	Tricloroetilene		79-01-6	602-027-00-9	Xn	20/22	2-25	
	1,2-O-(R)-(2,2,2-Tricloro-etiliden)-glucofuranosio	n. 256						
	O-(2,4,5-Tricloro-fenil)-O,O-dimetiltiofosfato	n. 521						
883	2,4,5-Triclorofenolo o 2,4,6-triclorofenolo		95-95-4 88-06-2	604-012-00-2	Xn	22-36/38	26-28	
	2-(2,4,5-Triclorofenossi)-etil-2,2-dicloropropionato	n. 470						
884	Triclorometano		67-66-3	602-006-00-4	Xn	20	2-24/25	
885	Tricloronato		327-98-0	015-098-00-0	T	26/27/28	1-13-45	
886	Tricloronitrometano		76-06-2	610-001-00-3	T	26/27/28-36/37/38	26-36-45	
(*) 887	1,2,3-Tricloropropano		96-18-4	602-062-00-X	Xn	20/21/22	37/39	D
888	Triclorosilano		10025-78-2	014-001-00-9	F	15-17	24/25-43	
889	Tricloro-s-triazina-2,4,6-trione		87-90-1	613-031-00-5	O-Xn	8-22-31-36/37	8-26-41	
890	alfa,alfa,alfa-Triclorotoluene		98-07-7	602-038-00-9	Xn	20	24/25	
891	2,4,6-Tricloro-1,3,5-triazina		108-77-0	613-009-00-5	Xi	36/37/38	28	

Numero d'ordine	SOSTANZA	Rif. sost.	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
892	Tricresilfosfati(miscele contenenti piu'del 1% di ortocresolo esterificato)			015-017-00-9	T	23/24/25-39	20/21/28-44	
893	Tricresilfosfati (miscele non contenenti piu'del 1% di ortocresolo esterificato)			015-018-00-4	Xn	21/22	28	
894	Tricresilfosfato (o-o-o,o-o-m,o-o-p,o-m-m,o-m-p,o-p-p)		1330-78-5	015-015-00-8	T	23/24/25-39	20/21-28-44	C
895	Tricresilfosfato (m-m-m,.m-m-p,m-p-p,p-p-p)			015-016-00-3	Xn	21/22	28	C
896	Tridemorph			613-020-00-5	Xn	20/21/22	2-13	
(*) 897	2,4,6-Tri(dimetil-aminometil)fenolo		90-72-2	603-069-00-0	Xn	22-36/38	26-28	
	Trielina	n. 882						
898	Trietilamina		121-44-8	612-004-00-5	F-Xi	11-36/37	16-26-29	
(**) 899	Trietilenglicole diacrilato			607-126-00-0	Xi	36/38-43	26-28	D
	Trietilentetramina	n. 325						
900	Trietilfosfato		78-40-0	015-013-00-7	Xn	22	25	
901	Trifenil fosfito		101-02-0	015-105-00-7	Xi	36/38	28	
902	alfa,alfa,alfa-Trifluorotoluene		98-08-8	602-056-00-7	F	11	16-23	
903	1,2,3-Triidrossibenzene		87-66-1	604-009-00-6	Xn	20/21/22		
	2-(Trimetil-acetil)-indan-1,3-dione	n. 744						
904	3,5,5-Trimetil-2-cicloesen-(1)-one		78-59-1	606-012-00-8	Xi	36/37/38	26	
(*) 905	2,2,4-Trimetilesametilen-1,6-diisocianato (1) 2,2,4-Trimetilesametilen-1,6-diisocianato(2) Miscele di (1) e (2)		16938-22-0 15646-96-5	615-010-00-6	T	23-36/37/38-42	26-28-38-45	C
906	2,4,4-Trimetil-1-pentene			601-031-00-8	F	11	9-16-29-33	
907	Trimetilpropan triacrilato		15625-89-5	607-111-00-9	Xi	36/38-43	39	D
908	2,4,6-Trinitroanisolo		606-35-3	609-011-00-0	E-Xn	2-20/21/22	35	
909	Trinitrobenzene		25377-32-6	609-005-00-8	E-T	2-26/27/28-33	35-45	C
910	Trinitroclorobenzene			610-004-00-X	E-T	2-26/27/28	35-45	C
911	Trinitrocresolo		28905-71-7	609-012-00-6	E-Xn	2-4-20/21/22	35	C
912	2,4,6-Trinitrofenolo		88-89-1	609-009-00-X	E-T	2-4-23/24/25	28-35-37-44	
913	2,4,6-Trinitroresorcinolo		82-71-3	609-018-00-9	E-Xn	2-4-20/21/22	35	
914	2,4,6-Trinitrotoluene		118-96-7	609-008-00-4	E-T	2-23/24/25-33	35-44	
915	Trinitroxilene		28852-33-7	609-013-00-1	E-Xn	2-20/21/22-33	35	C
916	1,3,5-Triossano		110-88-3	605-002-00-0	Xn	22	24/25	

Numero d'ordine	S O S T A N Z A	Rif. sost	CAS n.	N. CEE	CLASSIFICAZIONE ED ETICHETTATURA			
					Simbolo	R	S	Note
	Triossimetilene	n. 916						
917	Tris(2-cloroetil)fosfato		115-96-8	015-102-00-0	Xi	22-36/38		
918	Uranio			092-001-00-8	T	26/28-33	20/21/45	
919	Uranio composti			092-002-00-3	T	26/28-33	20/21-45	A
920	Vamidotion		2275-23-2	015-059-00-8	T	23/24/25	2-13-44	
921	Vanadio pentossido		1314-62-1	023-001-00-8	Xn	20	22	
922	Vinile acetato		108-05-4	607-023-00-0	F	11	16-23-29-33	D
923	Vinile bromuro		593-60-2	602-024-00-2	F	13	9-16-33	
924	Vinile cloruro		75-01-4	602-023-00-7	F-T	13-39	9-16-33	D
	Vinilidene cloruro	n. 347						
	2-Viniltoluene	n. 659						
925	Warfarin		81-81-2	607-056-00-0	T	26/27/28	1-13-44	
926	Xilene m		108-38-3	601-022-00-9	Xn	10-20	24/25	C
	o		95-47-6					
	p		106-42-3					
927	Xilenolo		1300-71-6	604-006-00-X	T	24/25-34	2-28-44	C
928	Xilidina		1300-73-8	612-027-00-0	T	23/24/25-33	28-36/37-44	C
929	Zinco alchili			030-004-00-8	F-C	14-17-34	16-43	A
930	Zinco cloruro		7646-85-7	030-003-00-2	C	34	7/8-28	
931	Zinco fosfuro		1314-84-7	015-006-00-9	T	28-32	1/2-20/21-22 28-45	
932	Ziram			006-012-00-2	Xn	22-38	2-13	
933	Zirconio in polvere (piroforica)		7740-67-7	040-001-00-3	F	15-17	7/8-43	
934	Zirconio in polvere (stabilizzata)			040-002-00-9		15	7/8-43	
935	Zolfo dicloruro		10545-99-0	016-013-00-X	C	14-34-37	26	
936	Zolfo monocloruro		10025-67-9	016-012-00-4	C	14-34-37	26	
937	Zolfo tetracloruro		13451-08-6	016-014-00-5	C	14-34-37	26	

ALLEGATO II

SIMBOLI ED INDICAZIONI DI PERICOLO

Nota: Le lettere E, O, F, F+, T, T+, C, Xn, Xi non fanno parte del simbolo.

ALLEGATO III

FRASI DI RISCHIO

R 1 Esplosivo allo stato secco.

R 2 Rischio di esplosione per urto, sfregamento, fuoco o altre sorgenti d'ignizione.

R 3 Elevato rischio di esplosione per urto, sfregamento, fuoco o altre sorgenti d'ignizione.

R 4 Forma composti metallici esplosivi molto sensibili.

R 5 Pericolo di esplosione per riscaldamento.

R 6 Esplosivo a contatto o senza contatto con l'aria.

R 7 Può provocare un incendio.

R 8 Può provocare l'accensione di materie combustibili.

R 9 Esplosivo in miscela con materie combustibili.

R 10 Infiammabile.

R 11 Facilmente infiammabile.

R 12 Altamente infiammabile.

R 13 Gas liquefatto altamente infiammabile.

R 14 Reagisce violentemente con l'acqua.

R 15 A contatto con l'acqua libera gas facilmente infiammabili.

R 16 Pericolo di esplosione se mescolato con sostanze comburenti.

R 17 Spontaneamente infiammabile all'aria.

R 18 Durante l'uso può formare con aria miscele esplosive/infiammabili.

R 19 Può formare perossidi esplosivi.

R 20 Nocivo per inalazione.

R 21 Nocivo a contatto con la pelle.

R 22 Nocivo per ingestione.

R 23 Tossico per inalazione.

R 24 Tossico a contatto con la pelle.

R 25 Tossico per ingestione.

R 26 Altamente tossico per inalazione.

R 27 Altamente tossico a contatto con la pelle.

R 28 Altamente tossico per ingestione.

R 29 A contatto con l'acqua libera gas tossici.

R 30 Può divenire facilmente infiammabile durante l'uso.

R 31 A contatto con acidi libera gas tossico.

R 32 A contatto con acidi libera gas altamente tossico.

R 33 Pericolo di effetti cumulativi.

R 34 Provoca ustioni.

R 35 Provoca gravi ustioni.

R 36 Irritante per gli occhi.

R 37	Irritante per le vie respiratorie.
R 38	Irritante per la pelle.
R 39	Pericolo di effetti irreversibili molto gravi.
R 40	Possibilità di effetti irreversibili.
(+) **R 41**	Rischio di gravi lesioni oculari.
R 42	Può provocare sensibilizzazione per inalazione.
R 43	Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.
(+) **R 44**	Rischio di esplosione per riscaldamento in ambiente confinato.
(+) **R 45**	Può provocare il cancro.
(+) **R 46**	Può provocare alterazioni genetiche ereditarie.
(+) **R 47**	Può provocare malformazioni congenite.
(+) **R 48**	Pericolo di gravi danni per la salute in caso di esposizione prolungata.

COMBINAZIONE DELLE FRASI R

R 14/15	Reagisce violentemente con l'acqua liberando gas facilmente infiammabili.
R 15/29	A contatto con l'acqua libera gas tossici e facilmente infiammabili.
R 20/21	Nocivo per inalazione e contatto con la pelle.
R 20/22	Nocivo per inalazione e ingestione.
R 20/21/22	Nocivo per inalazione, ingestione e contatto con la pelle.
R 21/22	Nocivo a contatto con la pelle e per ingestione.
R 23/24	Tossico per inalazione e contatto con la pelle.
R 23/25	Tossico per inalazione e ingestione.
R 23/24/25	Tossico per inalazione, ingestione e contatto con la pelle.
R 24/25	Tossico a contatto con la pelle e per ingestione.
R 26/27	Altamente tossico per inalazione e contatto con la pelle.
R 26/28	Altamente tossico per inalazione e per ingestione.
R 26/27/28	Altamente tossico per inalazione, ingestione e contatto con la pelle.
R 27/28	Altamente tossico a contatto con la pelle e per ingestione.
R 36/37	Irritante per gli occhi e le vie respiratorie.
R 36/38	Irritante per gli occhi e la pelle.
R 36/37/38	Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle.
R 37/38	Irritante per le vie respiratorie e la pelle.
R 42/43	Può provocare sensibilizzazione per inalazione e contatto con la pelle.

Nota: La lettera R seguita da numero d'ordine non fa parte integrante della frase.

ALLEGATO IV

CONSIGLI DI PRUDENZA

S 1 Conservare sotto chiave.

S 2 Conservare fuori della portata dei bambini.

S 3 Conservare in luogo fresco.

S 4 Conservare lontano da locali di abitazione.

S 5 Conservare sotto ... (liquido appropriato da indicarsi da parte del fabbricante).

S 6 Conservare sotto ... (gas inerte da indicarso da parte del fabbricante).

S 7 Conservare il recipiente ben chiuso.

S 8 Conservare al riparo dall'umidità.

S 9 Conservare il recipiente in luogo ben ventilato.

S 12 Non chiudere ermeticamente il recipiente.

S 13 Conservare lontano da alimenti o mangimi e da bevande.

S 14 Conservare lontano da ... (sostanze incompatibili da precisare da parte del produttore).

S 15 Conservare lontano dal calore.

S 16 Conservare lontano da fiamme e scintille-Non fumare.

S 17 Tenere lontano da sostanze combustibili.

S 18 Manipolare ed aprire il recipiente con cautela.

S 20 Non mangiare nè bere durante l'impiego.

S 21 Non fumare durante l'impiego.

S 22 Non respirare le polveri.

S 23 Non respirare i gas/fumi/vapori/aerosoli (termine (i) appropriato (i) da precisare da parte del produttore).

S 24 Evitare il contatto con la pelle.

S 25 Evitare il contatto con gli occhi.

S 26 In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S 27 Togliersi di dosso immediatamente gli indumenti contaminati.

S 28 In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con ... (prodotti idonei da indicarsi da parte del fabbricante).

S 29 Non gettare i residui nelle fognature.

S 30 Non versare acqua sul prodotto.

S 33 Evitare l'accumulo di cariche elettrostatiche.

S 34 Evitare l'urto e lo sfregamento.

S 35 Non disfarsi del prodotto e del recipiente se non con le dovute precauzioni.

S 36 Usare indumenti protettivi adatti.

S 37 Usare guanti adatti.

S 38 In caso di ventilazione insufficiente, usare un apparecchio respiratorio adatto.

S 39 Proteggersi gli occhi/la faccia.

S 40 Per pulire il pavimento e gli oggetti contaminati da questo prodotto, usare... (da precisare da parte del produttore).

S 41 In caso di incendio e/o esplosione non respirare i fumi.

S 42	Durante le fumigazioni usare un apparecchio respiratorio adatto (termine (i) appropriato (i) da precisare da parte del produttore).
S 43	In caso di incendio usare... (mezzi estinguenti idonei da indicarsi da parte del fabbricante. Se l'acqua aumenta il rischio precisare «Non usare acqua»).
S 44	In caso di malessere consultare il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).
S 45	In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).
(+) **S 46**	In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta.
(+) **S 47**	Conservare a temperatura non superiore a...C (da precisare da parte del fabbricante).
(+) **S 48**	Mantere umido con... (mezzo appropriato da precisare da parte del fabbricante).
(+) **S 49**	Conservare soltanto nel recipiente originale.
(+) **S 50**	Non mescolare con... (da specificare da parte del fabbricante).
(+) **S 51**	Usare soltanto in luogo ben ventilato.
(+) **S 52**	Non utilizzare su grandi superfici in locali abitati.

COMBINAZIONI DELLE FRASI S

S 1/2	Conservare sotto chiave e fuori della portata dei bambini.
S 3/7/9	Tenere il recipiente ben chiuso in luogo fresco e ben ventilato.
S 3/9	Tenere il recipiente in luogo fresco e ben ventilato.
(+) **S 3/9/14**	Conservare in luogo fresco e ben ventilato lontano da .... (materiali incompatibili da precisare da parte del fabbricante).
(+) **S 3/9/14/49**	Conservare soltanto nel contenitore originale in luogo fresco e ben ventilato lontano da (materiali incompatibili da precisare da parte del fabbricante).
(+) **S 3/9/49**	Conservare soltanto nel contenitore originale in luogo fresco e ben ventilato.
(+) **S 3/14**	Conservare in luogo fresco lontano da .... (materiali incompatibili da precisare da parte del fabbricante).
S 7/8	Conservare il recipiente ben chiuso e al riparo dall'umidità.
S 7/9	Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.
S 20/21	Non mangiare, né bere, né fumare durante l'impiego.
S 24/25	Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle.
S 36/37	Usare indumenti protettivi e guanti adatti.
S 36/37/39	Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.
S 36/39	Usare indumenti protettivi adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.
S 37/39	Usare guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.
(+) **S 47/49**	Conservare soltanto nel contenitore originale a temperatura non superiore a ... C (da precisare da parte del fabbricante).

Nota: La lettera S seguita dal numero d'ordine non fa parte integrante della frase.

ALLEGATO V

METODI SPERIMENTALI PER LA DETERMINAZIONE DELLE PROPRIETÀ FISICO- CHIMICHE, TOSSICOLOGICHE ED ECOTOSSICOLOGICHE

Il presente allegato espone alcuni metodi sperimentali per la determinazione delle proprietà fisico-chimiche, tossicologiche ed ecotossicologiche elencate nell'allegato I e nell'allegato II del decreto del Presidente della Repubblica 24 novembre 1981, n. 927.

Tali metodi si basano su quelli accettati e raccomandati da organismi internazinali competenti in materia (in particolare dall'OCSE). Laddove tali metodi non erano disponibili ne sono stati adottati altri rispondenti alle norme di uno Stato membro della Comunità Europea od all'accettazione del mondo scientifico.

Le prove devono in generale essere eseguite sulla sostanza così come essa viene commercializzata. È opportuno considerare l'eventuale influenza delle impurezze sui risultati delle prove stesse.

Qualora i metodi del presente allegato non risultino adeguati per lo studio di una determinata properietà, il notificante deve giustificare il metodo usato in alternativa.

Le prove e gli studi sugli animali verrano condotti conformemente ai regolamenti nazionali e dovranno tenere conto dei principi umanitari e degli sviluppi internazionali, nel settore della protezione degli animali. Tra due o più metodi equivalenti si sceglierà quello che necessita del numero meno elevato di animali.

SOMMARIO

PARTE A: METODI DI DETERMINAZIONE DELLE PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE

A. 1. PUNTO DI FUSIONE/INTERVALLO DI FUSIONE

1. METODO

I metodi descritti si basano sulle linee direttrici OCSE (1)..

1.1. Introduzione

I metodi e le apparecchiature qui illustrati si applicano alla determinazione del punto di fusione di sostanze chimiche senza alcuna limitazione rispetto al loro grado di purezza.

La scelta del metodo più idoneo dipende dalla natura della sostanza in esame. Di conseguenza, il fattore determinante sarà inerente al fatto che la sostanza sia facilmente, difficilmente, o per nulla polverizzabile.

Per alcune sostanze la determinazione del punto di gelo o di solidificazione risulta più vantaggioso; nelle linee direttrici vengono pertanto riportate anche le norme per questo tipo di determinazioni.

1.2. Definizioni ed unità

Il punto di fusione è definito come la temperatura alla quale si verifica la transizione di fase dallo stato solido allo stato liquido a pressione atmosferica normale.

Tale temperatura corrisponde teoricamente a quella di solidificazione o di gelo. Poiché per molte sostanze il passaggio di stato si verifica in un ampio intervallo di temperatura, questo viene spesso definito come intervallo di fusione.

Conversione delle unità (da K a °C):

$t = T - 273,15$

dove t è espresso in °C e T in K.

1.3. Sostanze di riferimento

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono essere impiegate essenzialmente per la calibrazione periodica nel metodo e per permettere il confronto dei risultati quando si ricorre ad un altro metodo.

Alcune sostanze di riferimento sono elencate nei riferimenti bibliografici (2).

1.4. Principio del metodo

Si determina la temperatura (o l'intervallo di temperatura) corrispondente al passaggio dallo stato solido a quello liquido. In pratica si determinano le temperature di fusione incipiente e di fusione finale durante il riscaldamento di un campione della sostanza in esame a pressione atmosferica.

Vengono illustrati tre metodi, e precisamente il metodo del capillare, quello degli elementi riscaldanti e quello del punto di congelamento.

1.4.1. *Metodo del capillare*

1.4.1.1. Apparecchi per la determinazione del punto di fusione tramite bagno liquido

Una piccola quantità della sostanza, finemente polverizzata, viene introdotta in un tubo capillare e sistemata compattamente. Si riscalda il tubicino insieme ad un termometro regolando l'aumento di temperatura in modo che sia inferiore a circa 1 K/min durante la fusione propriamente detta. Si determinano quindi le temperature iniziale e finale di fusione.

1.4.1.2. Blocco metallico

Si procede come indicato al punto 1.4.1.1, salvo per il fatto che il tubo capillare ed il termometro sono collocati in un blocco di metallo riscaldante, attraverso alcuni fori del quale è possibile la loro osservazione.

1.4.1.3. Determinazione tramite fotocellula

Il campione contenuto nel tubo capillare viene riscaldato automaticamente in un cilindro metallico. Attraverso un foro praticato nel cilindro un raggio luminoso viene convogliato sulla sostanza e raggiunge poi una fotocellula accuratamente tarata. Per la maggior parte delle sostanze le proprietà ottiche si modificano durante la fusione passando dall'opacità alla trasparenza. L'intensità della radiazione che raggiunge la fotocellula aumenta fino ad inviare un segnale di arresto all'indicatore numerico di un termometro a resistenza di platino collocato nella camera di riscaldamento. Questo metodo non è adatto nel caso di alcune sostanze fortemente colorate.

1.4.2. *Elementi riscaldanti*

1.4.2.1. Banco riscaldante di Kofler

Il banco riscaldante di Kofler fa uso di due corpi metallici di diversa conducibilità termica, riscaldati elettricamente; la sbarra è progettata in modo tale che per tutta la sua lunghezza il gradiente di temperatura è virtualmente costante. La temperatura dell'elemento riscaldante può variare da 283 K a 543 K; essa viene letta su un apposito strumento costituito da un cursore provvisto di indice e di linguetta specificamente realizzati per ogni banco. Per determinare un punto di fusione, la sostanza viene distribuita in un strato sottile direttamente sulla superficie dell'elemento riscaldante. In pochi secondi appare una linea di separazione netta tra la fase solida e quella liquida. La temperatura corrispondente a questa linea di separazione viene letta facendovi coincidere l'indice dello strumento.

1.4.2.2. Microscopio di fusione

Numerosi sono gli elementi riscaldanti forniti di microscopio utilizzati per la determinazione del punto di fusione di sostanze in quantità molto piccole. Nella maggioranza di questi strumenti, la temperatura viene determinata tramite una termocoppia, ma talvolta si ricorre anche a termometri a mercurio. La versione tipica di un microscopio con elemento riscaldante per il punto di fusione comprende una camera di riscaldamento fornita di una piastra metallica sopra la quale si pone il campione, distribuito su un vetrino. Al centro della piastra metallica si trova un foro che permette il passaggio della luce proveniente dallo specchio di illuminazione del microscopio. Durante la misura, la camera viene chiusa da una piastra di vetro in modo da escludere l'aria dalla zona di lavoro. Il riscaldamento del campione è regolato da un reostato. Per misure di grande precisione e nel caso di sostanze otticamente anisotrope, si può far uso di luce polarizzata.

1.4.2.3. Metodo del menisco

Questo metodo è specifico per le poliammidi. Esso si basa sulla determinazione della temperatura alla quale si osserva visualmente lo spostamento del menisco di un olio al silicone compreso tra un elemento riscaldante ed un coprioggetti sostenuto dal campione di poliammide in esame.

1.4.3. *Metodo per determinare il punto di congelamento*

Una provetta di tipo particolare viene riempita con il campione e posta in un apparecchio per la determinazione del punto di cristallizzazione. Il campione viene agitato con delicatezza e continuità durante il raffreddamento, e la temperatura viene letta e registrata ad intervalli di 30 secondi. Non appena la temperatura si mantiene costante per alcune letture, il relativo valore (corretto per l'errore termometrico) viene acquisito come punto di cristallizzazione.

1.5. **Criteri di qualità**

L'applicabilità e l'accuratezza dei vari metodi impiegati per la determinazione del punto di fusione/intervallo di fusione sono indicate nella seguente tabella.

TABELLA: APPLICABILITA DEI METODI

A. Metodi con impiego di capillare

Metodo di misura	Sostanze *polve-rizzabili*	Sostanze difficilmente polverizzabili	Intervallo di temperatura	Accuratezza massima approssimativa (1)	Osservazioni
Apparecchi di fusione a bagno liquido	Sì	Soltanto per alcune	Da 273 K a 573 K	± 0,3 K	Norme esistenti: JIS K 0064
Apparecchi per *il punto* di fusione con blocco metallico	Sì	Soltanto per alcune	Da 293 K a 573 K	± 0,5 K	Norme esistenti: ISO 1218 (E)
Determinazione con fotocellula	Sì	Svariate, con uso di accessori	Da 253 K a 573 K	± 0,1 K	

(1) In dipendenza del tipo di strumento e del grado di purezza della sostanza.

B. Metodi con impiego di elementi riscaldanti e metodi di congelamento

Metodo di misura	Sostanze polverizzabili	Sostanze difficilmente polverizzabili	Intervallo di temperatura	Accuratezza massima approssimativa (1)	Osservazioni
Banco riscaldante di Kofler	Sì	No	Da 283 K a 543 K	± 1,0 K	Norme esistenti: ANSI/ASTM D 3451-76
Microscopio di fusione	Sì	Soltanto per alcune	Da 273 K a 573 K (fino a 1773 K)	± 0,2 K	Norme esistenti: DIN 53736
Metodo del menisco	No	Specifico per le poliammidi	Da 293 K a 573 K	± 0,5 K	Norme esistenti: ISO 1218 (E)
Metodo del punto di congelamento	Per sostanze liquide	Per sostanze liquide	Da 223 K a 573 K	± 0,5 K	Norme esistenti: BS 4699

(1) In dipendenza del tipo di strumentazione e del grado di purezza della sostanza.

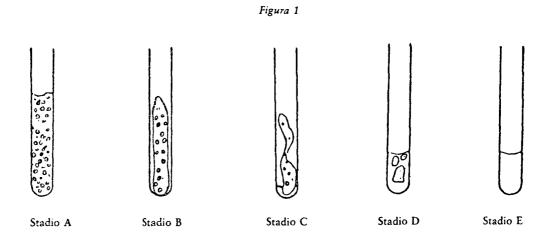
1.6. Descrizione dei metodi

Le procedure relative a quasi tutti i metodi di determinazione sono state descritte in varie norme internazionali e nazionali (vedi appendice).

1.6.1. *Metodi con tubo capillare*

Sostanze finemente polverizzate mostrano, durante un graduale aumento della temperatura, gli stadi di fusione riportati nella figura 1.

Figura 1

Stadio A Stadio B Stadio C Stadio D Stadio E

Stadio A (inizio della fusione; punto di bagnabilità): minuscole goccioline aderiscono uniformemente alla parete interna del capillare;

Stadio B (punto di contrazione): in seguito alla contrazione del fuso, va evidenziandosi uno spazio libero tra il campione e la parete interna;

Stadio C (punto di collasso): dopo essersi contratto, il campione inizia a scivolare in basso ed a liquefarsi;

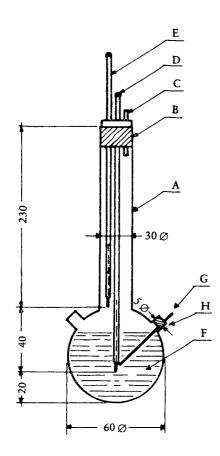
Stadio D (punto di liquefazione): si ha la formazione di un menisco completo sulla superficie del campione, anche se una quantità apprezzabile di esso è ancora solida;

Stadio E (stadio finale della fusione): non restano più particelle solide.

Durante la determinazione del punto di fusione vengono registrate tanto la temperatura iniziale che quella finale del processo di fusione.

1.6.1.1. Apparecchi per il punto di fusione a bagno liquido

La figura 2 presenta un tipo di apparecchio normalizzato, realizzato in vetro, per il punto il fusione (JIS K 0064); tutte le quote sono date in mm.

Figura 2

A: Recipiente di misura.
B: Tappo di sughero.
C: Sfogo.
D: Termometro.
E: Termometro ausiliario.
F: Bagno liquido.
G: Tubo capillare in vetro:
lunghezza da 80 a 100 mm; diametro interno 1,0 ± 0,2 mm; spessore da 0,2 a 0,3 mm.
H: Tubo laterale.

Bagno liquido:

A seconda del punto di fusione da determinare, il bagno liquido va scelto tra i seguenti: paraffina liquida per punti di fusione non superiori a 473 K; acido solforico concentrato o olio di silicone per punti di fusione non superiori a 573 K.

Per punti di fusione superiori a 523 K è possibile far ricorso ad una miscela contenente tre parti di acido solforico e due parti di solfato di potassio (un rapporto di peso).

Termometro:

Vanno impiegati soltanto termometri che soddisfano le prescrizioni delle norme ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001, o di norme equivalenti.

Modalità operative:

La sostanza secca va polverizzata finemente in un mortaio e posta in un tubo capillare chiuso per fusione ad una estremità, in modo che, dopo assestamento nella maniera più compatta possibile, l'altezza del riempimento sia di 3 mm circa. Per ottenere un assestamento uniforme del campione, il tubo capillare deve essere lasciato cadere attraverso una canna di vetro su un vetro da orologio da un'altezza di circa 700 mm. I capillari così riempiti vengono posti nel bagno liquido in modo tale che la parte centrale del bulbo del termometro a mercurio sia in contatto con il tubo capillare nella zona dove è collocato il campione. Il tubo capillare viene di solito introdotto nel recipiente di misura quando la temperatura è inferiore di circa 10 K a quella del punto di fusione.

Il bagno liquido va riscaldato in modo che l'aumento di temperatura corrisponda a circa 3 K/min. Il bagno liquido va mantenuto sotto agitazione. A circa 10 K al di sotto della temperatura prevista di fusione, la velocità di incremento della temperatura va regolata ad un massimo di 1 K/min.

Calcolo:

Il punto di fusione va calcolato con la formula seguente:

$$T = T_D + 0{,}00016\,(T_D - T_E)n$$

dove:

T = temperatura di fusione corretta, in K,

T_D = lettura della temperatura al termometro D, in K,

T_E = lettura della temperatura al termometro E, in K,

n = numero di graduazioni della colonnina di mercurio sul termometro D allo stelo emergente.

1.6.1.2. Blocco metallico

Apparecchiatura

La strumentazione consiste in:

— un blocco cilindrico di metallo, la cui parte superiore è cava e forma una camera (vedi figura 3);
— un tappo metallico provvisto di due o più fori per permettere l'inserimento dei tubi capillari nel blocco metallico;
— un sistema di riscaldamento per il blocco metallico realizzato, per esempio, tramite una resistenza elettrica incorporata nel blocco;
— un reostato per la regolazione della potenza applicata, se si fa uso del riscaldamento elettrico;
— quattro finestre di vetro resistente al calore sulle pareti laterali della camera, disposte diametralmente ad angolo retto l'una rispetto all'altra. Di fronte ad una di esse è montato un oculare per l'osservazione del capillare. Le altre tre finestre vengono usate per illuminare l'interno per mezzo di lampade;
— un capillare di vetro resistente al calore chiuso ad una estremità (vedi punto 1.6.1.1).

Termometro:

Vedi norme 1.6.1.1.

Possono utilizzarsi anche strumenti termoelettrici di analoga accuratezza.

Figura 3

Modalità operative:

Vedi punto 1.6.1.1. In questo caso non va applicata la correzione per il termometro. La temperatura letta rappresenta il punto di fusione.

1.6.1.3. Determinazione tramite fotocellula

Apparecchiatura e modalità operative:

La strumentazione consiste in una camera metallica con un sistema automatico di riscàldamento. Si riempiono tre capillari secondo le indicazioni del punto 1.6.1.1 e si pongono nella camera.

Per la taratura dell'apparecchio sono disponibili cinque velocità di incremento lineare della temperatura. L'aumento opportuno della temperatura è regolato elettricamente per un andamento regolare e costante. Un sistema di registrazione indica la temperatura effettiva nel forno, nonché di fusione della sostanza contenuta nei capillari.

1.6.2. *Elementi riscaldanti*

1.6.2.1. Banco riscaldante di Kofler

Vedi appendice.

1.6.2.2. Microscopi di fusione

Vedi appendice.

1.6.2.3. Metodo del menisco (per poliammidi)

Vedi appendice.

La velocità di aumento della temperatura fino al punto di fusione deve essere inferiore a 1 K/min.

1.6.3. *Metodi per la determinazione del punto di congelamento*

Vedi appendice.

2. DATI

In alcuni casi si rende necessaria una correzione della lettura termometrica.

3. RELAZIONE

Il metodo impiegato va indicato.

Il punto di fusione riportato deve essere la media di almeno due misure comprese nel campo di accuratezza approssimativa (vedi tabella). Va inoltre fornita una stima dell'accuratezza. Se la differenza tra la temperatura iniziale e quella finale della fusione rientra nei limiti dell'accuratezza, si assume quale punto di fusione la temperatura della fase finale; in caso contrario vanno riportate ambedue le temperature.

Talune sostanze si decompongono o sublimano prima di raggiungere il punto di fusione. Se ciò si verifica, ne va fatta menzione.

Vanno fornite tute le informazioni ed osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in modo particolare per quel che riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) IUPAC, Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, Pure and Applied Chemistry, Vol. 48, 1976, p. 505 — 515.

Appendice

Per ulteriori particolari tecnici, si possono consultare ad esempio le seguenti norme:

1. **Metodi basati sull'impiego di capillari**

1.1. *Apparecchi a bagno liquido*

ASTM E 324-69	Standard Test Method for Relative Initial and Final Melting Points and the Melting Range of Organic Chemicals.
BS 4634	Method for the Determination of Melting Point and/or Melting Range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing Methods for Melting Point of Chemical Products

1.2. *Apparecchi a blocco di metallo*

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics-Polyamides-Determination of «Melting Point»

2. **Apparecchi ad elementi riscaldanti**

2.1. *Banco riscaldante di Kofler*

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard Recommended Practices for Testing Polymeric Powder Coatings

2.2. *Microscopio di fusione*

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. *Metodo del menisco (poliammidi)*

ISO 1218 (E)	Plastics-Polyamides-Determination of «Melting-Point»
ANSI/ASTM D 2133-66	Standard Specification for acetal Resin Injection Molding and Extrusion Materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du «point de fusion». Méthode du ménisque

3. **Metodi per la determinazione del punto di congelamento**

BS 4633	Method for the Determination of Crystallizing Point
BS 4695	Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve)
DIN 10319	Bestimmung des Gefrierpunktes von Milch

DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
DIN 51556	Bestimmung des Erstarrungspunktes am rotierenden Thermometer
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines

A. 2. PUNTO DI EBOLLIZIONE/INTERVALLO DI EBOLLIZIONE

1. METODO

I metodi descritti si basano sulle linee direttrici OCSE (1).

1.1. Introduzione

I metodi e le apparecchiature qui illustrati possono essere applicati a sostanze liquide purché queste non subiscano trasformazioni chimiche al di sotto del punto di ebollizione (come, ad esempio, autossidazione, trasposizione, degradazione, ecc.). I metodi possono essere applicati a sostanze liquide sia pure che impure.

Si dà particolare risalto al metodo basato sulla determinazione tramite fotocellula, dal momento che esso permette la misura sia del punto di fusione che di quello di ebollizione. In questo caso inoltre, le misure possono essere automatizzate.

Il «metodo dinamico» presenta il vantaggio di poter essere utilizzato anche per la determinazione della tensione di vapore e di non richiedere alcuna correzione della temperatura di ebollizione per riportarla a pressione normale (101,325 kPa) dal momento che la pressione può essere regolata al valore standard durante la misura. Questo metodo, tuttavia, non è stato ancora automatizzato.

Osservazioni

L'influenza delle impurezze sulla determinazione del punto di ebollizione dipende in misura notevole dalla natura delle impurezze stesse. L'effetto può essere considerevole se nel campione si trova un solvente altamente volatile.

La composizione del campione in esame varia infatti da una misura all'altra in conseguenza della volatilizzazione dei componenti bassobollenti: in questo caso si ottengono valori di volta in volta maggiori.

1.2. Definizioni ed unità

Il punto di ebollizione normale è definito come temperatura alla quale la tensione del vapore saturo di un liquido eguaglia la pressione normale. Il punto di ebollizione misurato dipende dalla pressione atmosferica. Questa dipendenza è descritta quantitativamente dall'equazione di Clausius-Clapeyron:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3\, RT} + \text{cost.}$$

dove:

p = tensione di vapore della sostanza espressa in Pascal,

ΔH_v = calore di evaporazione in $J\ mol^{-1}$,

R = costante universale dei gas = $8,31\ J\ mol^{-1}\ K^{-1}$,

T = temperatura espressa in K.

La temperatura al punto di ebollizione (temperatura di ebollizione) viene riportata facendo menzione del valore della pressione ambiente durante la misura.

Fattori di conversione:

Pressione (unità: kPa).

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa (l'uso delle unità «bar» è ancora permesso, ma non raccomandato).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr (l'uso delle unità «mm Hg» e «Torr» non è più permesso).

Temperatura (unità: K).

$t = T - 273,15$

dove t è espresso in °C e T in K.

1.3. **Sostanze di riferimento**

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono essere impiegate essenzialmente per la calibrazione periodica del metodo e per permettere il confronto dei risultati quando si ricorre ad un altro metodo.

Alcune sostanze di riferimento sono elencate nei metodi riportati nell'appendice.

1.4. **Principio dei metodi**

Tutti i metodi per la determinazione del punto di ebollizione (o dell'intervallo di ebollizione) si basano sulla misura della temperatura di ebollizione. I metodi descritti sono cinque.

1.4.1. *Determinazione tramite ebulliometro*

Gli ebulliometri sono stati originariamente concepiti per la determinazione del peso molecolare tramite l'innalzamento del punto di ebollizione, ma si prestano altrettanto bene per accurate misure del punto di ebollizione. Una apparecchiatura molto semplice è descritta nella norma ASTM D 1120-72 (vedi appendice). Con questo strumento il liquido viene riscaldato fino all'ebollizione in condizioni di equilibrio a pressione atmosferica.

1.4.2. *Metodo dinamico*

Il metodo si basa sulla misura della temperatura di ricondensazione del vapore per mezzo di una termocoppia collocata nella zona di riflusso. Questo metodo permette la variazione della pressione.

1.4.3. *Metodo della distillazione per il punto di ebollizione e l'intervallo di ebollizione*

Il metodo si basa sulla distillazione del liquido e sulla misura della temperatura di ricondensazione del vapore con determinazione della quantità di distillato.

1.4.4. *Metodo di Siwolobov*

Il campione viene riscaldato in una provetta immersa a sua volta nel liquido di un bagno riscaldante. Nella provetta contenente il campione viene introdotto un capillare chiuso per fusione ad un estremo e contenente una bollicina d'aria nella parte inferiore.

Viene determinata la temperatura alla quale si ha emissione di una serie regolare di bollicine dal capillare, ovvero la temperatura alla quale l'emissione di bollicine, per raffreddamento momentaneo, cessa ed il fluido inizia di colpo a risalire nel capillare.

1.4.5. *Determinazione tramite fotocellula*

Si impiega il metodo di Siwolobov, applicando tuttavia la misura fotoelettrica della fase di emissione delle bollicine.

1.5. **Criteri di qualità**

La tabella 1 riporta l'applicabilità e l'accuratezza dei vari metodi utilizzati per la determinazione del punto di ebollizione/intervallo di ebollizione.

1.6. **Descrizione dei metodi**

I procedimenti relativi ad alcuni dei metodi citati sono descritti in varie norme internazionali e nazionali (vedi appendice).

1.6.1. *Ebulliometro*

Vedi appendice.

1.6.2. *Metodo dinamico*

Vedi metodo A.4 per la determinazione della tensione di vapore.

Si assume come temperatura di ebollizione quella misurata in corrispondenza di una pressione di 101,325 kPa.

1.6.3. *Metodo della distillazione (intervallo di ebollizione)*

Vedi appendice.

TABELLA 1: CONFRONTO DEI METODI

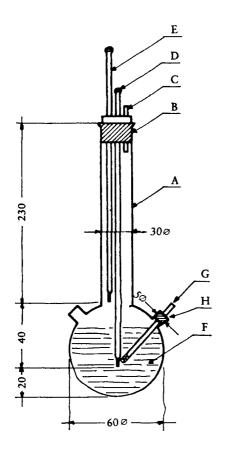
Metodo di misura	Accuratezza approssimativa	Osservazioni
Ebulliometro	± 1,4 K (fino a 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (oltre 373 K) (1) (2)	Norme esistenti: ASTM D 1120-72 (1)
Metodo dinamico	± 0,5 K	
Metodo della distillazione (intervallo di ebollizione)	± 0,5 K	Norme esistenti: ISO/R 918 DIN 53171 BS 4591/71
Metodi di Siwolobov	da ± 1 K a ± 2 K (2)	
Determinazione tramite fotocellula	± 0,3 K (a 373 K) (2)	

(1) Questo livello di accuratezza è valido soltanto nel caso di una strumentazione semplice, come ad esempio quella descritta nella norma ASTM D 1120-72; esso può essere migliorato con ebulliometri di realizzazione più complessa.
(2) Valida solo per sostanze pure.

1.6.4. *Metodo di Siwolobov*

Il campione, contenuto in una provetta del diametro approssimativo di 5 mm, viene riscaldato in un apparecchio per il punto di fusione (vedi figura 1).

La figura 1 presenta un tipo di apparecchiatura standardizzata per la determinazione del punto di fusione e di ebollizione (JIS K 0064) (realizzata in vetro; tutte le quote sono in mm).

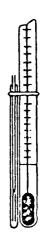
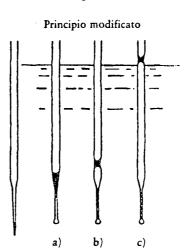
Figura 1

A: Recipiente di misura.
B: Tappo.
C: Sfogo.
D: Termometro.
E: Termometro ausiliario.
F: Bagno liquido.
G: Provetta contenente il campione:
diametro esterno massimo 5 mm; tubo capillare di lunghezza di 100 mm circa, di diametro interno di 1 mm circa e con spessore della parete da 0,2 a 0,3 mm.
H: Tubo laterale.

Nella provetta viene posto un tubo capillare (capillare di ebollizione) fuso a circa 1 cm dall'estremità inferiore. Il livello di riempimento della sostanza in esame deve essere tale che la parte fusa del capillare si trovi al di sotto della superficie del liquido. La provetta contenente il capillare di ebollizione può essere assicurata al termometro con un elastico oppure fissata tramite un sostegno laterale (vedi figura 2).

Figura 2

Principio secondo Siwoloboff

Figura 3

Principio modificato

Il liquido per il bagno va scelto in funzione della temperatura di ebollizione. Per temperatura fino a 573 K si può impiegare acido solforico od olio di silicone. La paraffina liquida può essere impiegata solo fino a 473 K. Il riscaldamento del bagno liquido deve essere regolato in modo che l'incremento di temperatura sia inizialmente di circa 3 K/min. Il liquido del bagno va tenuto in agitazione. A circa 10 K al di sotto della temperatura di ebollizione prevista, il riscaldamento va diminuito in maniera da ridurre la velocità di aumento della temperatura a meno di 1 K/min. In prossimità della temperatura di ebollizione, dal capillare cominciano a svilupparsi bollicine.

Si raggiunge il punto di ebollizione quando la serie di bollicine, per raffreddamento momentaneo, cessa ed il fluido inizia di colpo a risalire nel capillare. La corrispondente lettura termometrica rappresenta la temperatura di ebollizione della sostanza.

Secondo il principio modificato (vedi figura 3) il punto di ebollizione viene determinato in un capillare per il punto di fusione. Questo viene sfinato per circa 2 cm (a) e con esso si aspira una piccola quantità del campione. L'estremità aperta della parte sfinata viene chiusa alla fiamma in modo da far restare una bollicina d'aria in vicinanza della punta. Durante il riscaldamento nell'apparecchio per il punto di fusione (b) la bolla d'aria si dilata. Il punto di ebollizione corrisponde alla temperatura alla quale il menisco superiore della sostanza raggiunge il livello della superficie del bagno liquido (c).

1.6.5. *Determinazione tramite fotocellula*

Il campione viene riscaldato in un tubicino capillare all'interno di un blocco metallico riscaldante.

Tramite opportune aperture sul blocco, un raggio di luce viene fatto passare attraverso la sostanza e colpisce una fotocellula accuratamente tarata.

Durante l'aumento della temperatura del campione, dal capillare di ebollizione emergono bollicine d'aria isolate. Quando viene raggiunta la temperatura di ebollizione, il numero di bollicine aumenta enormemente. Ciò fa variare l'intensità della luce misurata dalla fotocellula, inviando un segnale di arresto all'indice di un termometro a resistenza di platino collocato nel blocco.

Questo metodo risulta particolarmente vantaggioso poiché permette determinazioni al di sotto della temperatura ambiente fino a 253,15 K (−20 °C) senza modifiche dell'apparecchiatura. È solo necessario porre lo strumento in un ambiente freddo o in un bagno di raffreddamento. Le modalità esatte per la determinazione del punto di ebollizione possono essere desunte dal manuale di istruzioni dello strumento.

2. DATI

Per piccole variazioni dalla pressione normale (± 5 kPa al massimo), la temperatura di ebollizione deve essere ricondotta al valore corretto T_n tramite la seguente equazione numerica di Sidney-Young:

$$T_n = T + f_T \times \Delta p$$

dove:

Δp = (101,325 — p) (notare il segno),

p = valore misurato della pressione, in kPa,

f_T = coefficiente di variazione del punto di ebollizione con la pressione, in K/kPa,

T = valore misurato della temperatura, in K,

T_n = temperatura di ebollizione corretta a pressione normale, in K.

Per molte sostanze i coefficienti di temperatura f_T e le equazioni per il loro calcolo approssimativo sono indicati nelle norme internazionali e nazionali prima citate.

A titolo di esempio, il metodo DIN 53171 cita i seguenti coefficienti approssimativi per i solventi contenuti nelle vernici:

TABELLA 2: COEFFICIENTE DI VARIAZIONE DELLA TEMPERATURA (f_T)

Temperatura T in K	Coefficiente di variazione f_T in K/kPa
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3. RELAZIONE

Il metodo impiegato va indicato. Il punto di ebollizione riportato deve essere la media di almeno due misure comprese nel campo di accuratezza approssimativa indicato nella tabella 1. Se le determinazioni non risultano riproducibili, vanno presi in considerazione altri metodi.

I valori dei punti di ebollizione misurati e la loro media devono essere indicati, e la pressione (o le pressioni) a cui sono state effettuate le misure devono esse espresse in kPa.

La pressione dovrebbe essere preferibilmente vicina a quella normale. Se una sostanza bolle in un intervallo di temperatura, questo va indicato. Devono essere fornite stime dell'accuratezza per tutti i risultati.

Vanno fornite tutte le informazioni ed osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in modo particolare per quel che riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

Appendice

Per ulteriori particolari tecnici, si possono ad esempio consultare le norme seguenti:

1. **Ebulliometro**

ASTM D 1120-72	Standard Test Method for Boiling Point of Engine Antifreezes

2. **Metodo della distillazione (intervallo di ebollizione)**

ISO/R 918	Test Method for distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for Determination of Distillation of Petroleum Products
BS 4591/71	Method for the Determination of Distillation Characteristics
DIN 53171	Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes

A. 3. DENSITÀ RELATIVA

1. METODO

I metodi descritti si basano sulle linee direttrici OCSE (1).

1.1. Introduzione

I metodi qui illustrati si applicano alle sostanze solide e liquide senza alcuna limitazione rispetto al loro grado di purezza.

I vari metodi da utilizzare sono elencati nella tabella.

1.2. Definizioni ed unità

La densità relativa D_4^{20} di solidi o liquidi è data dal rapporto tra la massa di un determinato volume della sostanza in esame, misurata a 20 °C, e la massa di un ugual volume di acqua, misurata a 4 °C. La densità relativa è una grandezza adimensionale.

La densità (ρ) di una sostanza è data dal rapporto tra una determinata massa m e il volume corrispondente v.

Nel sistema di unità SI la densità viene espressa in kg/m^3.

1.3. Sostanze di riferimento (1) (2)

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono essere impiegate essenzialmente per la calibrazione periodica del metodo e per permettere il confronto dei risultati.

1.4. Principio dei metodi

I metodi utilizzati sono quattro.

1.4.1. *Metodi per galleggiamento*

1.4.1.1. Areometro (per sostanze liquide)

Determinazioni rapide e sufficientemente accurate della densità possono essere eseguite per mezzo di areometri galleggianti, che permettono di dedurre la densità di un liquido dal grado di immersione desunto da una scala graduata.

1.4.1.2. Bilancia idrostatica (per sostanze solide e liquide)

La differenza tra il peso di un campione in aria e quello in acqua può essere utilizzata per determinarne la densità. Nel caso dei solidi, la densità così misurata va considerata valida solo per il particolare campione in esame. Per la determinazione della densità dei liquidi, un corpo di volume V noto viene pesato prima in aria e poi nel liquido stesso.

1.4.1.3. Metodo ad immersione di sfera (per sostanze liquide) (3)

Con questo metodo la densità di un liquido viene determinata in base alla differenza tra i valori ottenuti pesando il liquido prima e dopo l'immersione di una sfera di volume noto nel liquido stesso

1.4.2. *Metodi picnometrici*

Per solidi o liquidi possono impiegarsi picnometri di varia forma e di volume noto. La densità si calcola in base alla differenza di peso tra il picnometro pieno e quello vuoto ed al suo volume noto.

1.4.3. *Picnometro di comparazione ad aria* (per solidi)

La densità di un solido di forma qualsiasi può essere determinata a temperatura ambiente con il picnometro di comparazione a gas. Il volume di una sostanza viene misurato in aria o in un gas inerte all'interno di un cilindro tarato di volume variabile. Per il calcolo della densità va effettuata una misura di massa successivamente a quella di volume.

1.4.4. *Densimetro ad oscillazione* (4) (5) (6)

La densità di un liquido può essere determinata per mezzo di un densimetro ad oscillazione. Un oscillatore meccanico avente la forma di un tubo ad U viene fatto vibrare ad una frequenza particolare in dipendenza della massa dell'oscillatore. L'introduzione di un campione varia la frequenza di risonanza dell'oscillatore. L'apparecchio va calibrato con due sostanze di densità nota.

Tali sostanze vanno preferibilmente selezionate in modo da coprire l'intervallo in cui si effettuano le misure.

1.5. **Criteri di qualità**

L'applicabilità dei vari metodi impiegati per la determinazione della densità relativa è indicata nella tabella.

L'accuratezza di cui fa menzione la norma ISO si riferisce soltanto a sostanze pure.

1.6. **Descrizione dei metodi**

Nell'appendice sono riportate a titolo di esempio alcune delle norme da consultare per ulteriori dettagli tecnici.

Le prove vanno eseguite a 20 °C effettuando almeno due misure.

2. DATI

Vedi norme.

3. RELAZIONE

Il metodo standard impiegato va indicato.

La densità relativa D_4^{20} deve essere indicata secondo quanto prescritto al punto 1.2, insieme allo stato fisico della sostanza esaminata.

Vanno fornite tutte le informazioni ed osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in modo particolare per quel chè riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

TABELLA: APPLICABILITÀ DEI METODI

Metodi di misura	Densità		Viscosità dinamica massima possibile	Osservazioni
	solidi	liquidi		
1.4.1.1. Areometro		×	5 Pa s	Norme esistenti: ISO 387 ISO/R 649
1.4.1.2. Bilancia idrostatica:				Norme esistenti:
a) solidi	×			ISO/R 1185 (A)
b) liquidi		×	5 Pa s	ISO/R 91 e R 758
1.4.1.3. Metodo ad immersione di sfera		×	20 Pa s	Norme esistenti: DIN 53217
1.4.2. Picnometro:				Norme esistenti: ISO/R 3507
a) solidi	×			ISO/R 1183 (B)
b) liquidi		×	500 Pa s	ISO/R 758
1.4.3. Picnometro di comparazione ad aria	×			Norme esistenti: DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4. Densimetro ad oscillazione		×	5 Pa s	

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) IUPAC, Recommended reference materials for realisation of Physico-chemical Properties. — Pure and Applied Chemistry, Vol. 48, 1976, p. 508.

(3) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, Vol. 11, 1979, p. 427—430.

(4) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, Vol. 19, 1970, p. 297—302.

(5) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen-Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, Vol. 37, 1975, p. 717—726.

(6) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, Vol. 9, 1976, p. 253—255.

Appendice

Per ulteriori particolari tecnici, possono essere consultate, a titolo d'esempio, le seguenti norme:

1. **Metodi per galleggiamento**

1.1. *Areometro*

DIN 12790	Hydrometer; general instructions
ISO 387	
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation
ISO/R 649	
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. *Bilancia idrostatica*

Per sostanze solide:

ISO R 1183	Method A. Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Per sostanze liquide:

ISO R 91 ISO R 758

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62

ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. *Metodo ad immersione di sfera*

DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer (un ampliamento del metodo ad immersione di sfera verrà pubblicato nel coroso del 1981)

2. **Metodi picnometrici**

2.1. *Per sostanze liquide:*

ISO 3507	Pycnometers
ISO/R 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6}$ m^2s^{-1} at 15 °C)

DIN 12800	Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6}$ m^2s^{-1} at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)
DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have a too high vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol-water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in-thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15; Rubber products-Chemical analysis
ASTM D 2111	Method C; Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method

2.2. *Per sostanze solide*

ISO/R 1183	Method B. Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Picnometro di comparazione ad aria**

DIN 55990	Parte 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

A. 4. TENSIONE DI VAPORE

1. METODO

I metodi descritti sono basati sulle linee direttrici OCSE (1).

1.1. Introduzione

Per l'esecuzione della prova in oggetto è utile disporre di informazioni preliminari sulla struttura, il punto di fusione ed il punto di ebollizione della sostanza in esame.

Non esiste un procedimento unico che sia applicabile a tutto l'intervallo dei valori di tensione di vapore. Si raccomanda pertanto di usare più di un metodo per la misura di tensioni di vapore da $< 10^{-3}$ Pa a 10^5 Pa.

La presenza di impurezze modifica in genere la tensione di vapore. L'influenza delle impurezze sulla determinazione della tensione di vapore dipende in larga misura dalla loro natura. L'effetto può essere notevole se nel campione si trova un solvente altamente volatile.

1.2. Definizioni ed unità

La tensione di vapore di una sostanza è definita come la pressione di saturazione al di sopra di un solido o di un liquido. All'equilibrio termodinamico, la tensione di vapore di una sostanza pura è funzione della sola temperatura.

L'unità SI di pressione da utilizzare è il Pascal (Newton/m^2). Altre unità impiegate in passato sono elencate qui di seguito con i relativi fattori di conversione:

1 Torr (mm Hg) = $1{,}333 \times 10^2$ Pa

1 Atmosfera (atmosfera fisica) = $1{,}013 \times 10^5$ Pa

1 Atmosfera (atmosfera tecnica) = $9{,}81 \times 10^4$ Pa

1 Baria = 10^5 Pa

L'unità SI di temperatura è il grado Kelvin (K).

1.3. Sostanze di riferimento

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono essere impiegate essenzialmente per la calibrazione periodica del metodo e per permettere il confronto dei risultati quando si ricorre ad un altro metodo.

1.4. Principio del metodo

Per la determinazione della tensione di vapore si propongono cinque metodi, che possono essere applicati a diversi intervalli della tensione di vapore. Per ciascun metodo, la tensione di vapore viene determinata a varie temperature. In un intervallo di temperatura limitato, il logaritmo della tensione di vapore di una sostanza pura è funzione lineare del reciproco della temperatura.

1.4.1. *Metodo dinamico*

Il metodo dinamico prevede la misura della temperatura di ebollizione corrispondente ad una determinata pressione.

Intervallo di valori raccomandato

da 10^3 Pa a 10^5 Pa, per temperature tra 20 °C e 100 °C. Questo metodo è stato raccomandato anche per la determinazione del punto di ebollizione ed a questo fine esso è utilizzabile fino a 350 °C.

1.4.2. *Metodo statico*

Tramite il processo statico si determina la tensione di vapore che si stabilisce ad una determinata temperatura in un sistema chiuso in equilibrio termodinamico.

Questo metodo si presta per sostanze solide e liquide ad una o più fasi.

Intervallo di valori raccomandato:

da 10 Pa fino a 10^5 Pa, per temperature comprese tra 0 °C e 100 °C.

1.4.3. *Isoteniscopio*

Questo metodo standardizzato è a sua volta un procedimento statico, ma non è generalmente utilizzabile per sistemi a più componenti. Ulteriori dettagli sono reperibili nel metodo ASTM D-2879-75.

Intervallo di valori raccomandato:

da 100 Pa a 10^5 Pa, per temperature comprese tra 0 °C e 100 °C.

1.4.4. *Bilancia a tensione di vapore*

Si determina la quantità di sostanza che, nell'unità di tempo, abbandona una cella attraverso una apertura di dimensioni note e sotto condizioni di vuoto tali che il ritorno della sostanza nella cella sia trascurabile (per esempio, tramite determinazione dell'impulso trasmesso ad una bilancia sensibile da un getto di vapore, oppure misurando la perdita di peso).

Intervallo di valori raccomandato:

da 10^{-3} Pa a 1 Pa, per temperature comprese tra 0 °C e 100 °C.

1.4.5. *Metodo di saturazione del gas*

Una corrente di gas trasportatore inerte viene fatta passare sulla sostanza in esame in modo tale che detto gas si saturi del vapore della sostanza stessa; il vapore viene poi raccolto in un opportuno condensatore. La quantità di sostanza trasportata da una quantità nota del gas di trasporto permette il calcolo della tensione di vapore ad una data temperatura.

Intervallo di valori raccomandato:

fino a 1 Pa.

1.5. **Criteri di qualità**

Si confrontano i vari metodi per la determinazione della tensione di vapore per quanto attiene alla loro applicabilità, ripetibilità, riproducibilità, intervallo di misura e standard esistenti. Il confronto è riportato nella seguente tabella.

TABELLA: CRITERI DI QUALITÀ

Metodo di misura	Sostanze		Ripetibilità stimata (¹)	Riproducibilità stimata (¹)	Intervallo raccomandato	Norme esistenti
	solide	liquide				
1.4.1. Metodo dinamico		×	fino al 25 %	fino al 25 %	Da 10^3 Pa a $2 \cdot 10^3$ Pa	—
			1— 5 %	1— 5 %	Da $2 \cdot 10^3$ Pa a 10^5 Pa	—
1.4.2. Metodo statico	×	×	5—10 %	5—10 %	Da 10 Pa a 10^5 Pa	—
1.4.3. Isoteniscopio	×	×	5—10 %	5—10 %	Da 10^2 Pa a 10^5 Pa	ASTM-D 2879-75
1.4.4. Bilancia a pressione di vapore	×	×	5—20 %	fino al 50 %	Da 10^{-3} Pa a 1 Pa	—
1.4.5. Metodo di saturazione del gas	×	×	10—30 %	fino al 50 %	Da $< 10^{-3}$ Pa fino a 1 Pa	—

(¹) Dipendente dal grado di purezza.

1.6. Descrizione dei metodi

1.6.1. *Misura dinamica*

1.6.1.1. Apparecchiatura

L'apparecchio di misura consiste generalmente in un recipiente per l'ebollizione provvisto di refrigerante in vetro o metallo (vedi figura 1) della strumentazione per regolare e misurare la temperatura e di quella per regolare e misurare la pressione. Un tipico apparecchio di misura è realizzato, come mostra la figura, in vetro resistente al calore ed è composto di 5 parti.

Il tubo grande, parzialmente a doppia parete, consiste in un giunto smerigliato a camicia, un recipiente di raffreddamento ed un ingresso.

Il cilindro di vetro, provvisto di pompa Cottrel, è montato sulla sezione di ebollizione del tubo ed è fornito di una superficie scabra di frammenti di vetro per evitare la formazione di grosse bolle durante il processo di ebollizione.

La temperatura è misurata mediante una termocoppia od un termometro a resistenza immerso in una piccola quantità d'olio. Il termometro è alloggiato nel tubo di carica, che è provvisto di un giunto smerigliato maschio ed è chiuso sul fondo.

Il giunto a croce assicura i collegamenti necessari con le apparecchiature di regolazione e misura della pressione.

Il bulbo, che agisce da polmone, è collegato allo strumento di misura tramite un tubo capillare.

Per riscaldare il recipiente di ebollizione si impiega un elemento riscaldante, che viene inserito dall'esterno e dal basso nell'apparecchiatura di vetro. La corrente di riscaldamento prescelta viene selezionata mediante un trasformatore regolatore di tensione ed è controllata tramite un amperometro.

Si impiega una pompa ad olio per arrivare al grado di vuoto prestabilito tra 10^2 e 10^5 Pa circa.

Una bombola di azoto viene impiegata per regolare la pressione sul valore desiderato; essa è collegata per mezzo di una valvola che serve inoltre per il rientro dell'aria nell'apparecchio.

Per la misura della pressione si impiega un manometro di precisione collegato con il raccordo a croce.

1.6.1.2. Procedimento di misura

La tensione di vapore viene determinata tramite misura del punto di ebollizione del campione a varie pressioni prestabilite, comprese all'incirca tra 10^3 Pa e 10^5 Pa. La costanza della temperatura a pressione costante indica che si è raggiunto il punto di ebollizione (l'equilibrio di ebollizione nel caso di una miscela). Questo metodo non è adatto per la determinazione nel caso di sostanze che formano schiuma.

Per effettuare la determinazione, tutte le parti in vetro devono essere preliminarmente pulite ed asciugate accuratamente, e quindi evacuate sotto zavorra gassosa. La sostanza viene poi introdotta nell'apparecchio. Se i solidi non sono sotto forma di polvere, possono verificarsi difficoltà durante la fase di riempimento, evitabili tuttavia mediante riscaldamento della camicia d'acqua refrigerante. Dopo il riempimento, l'apparecchiatura viene montata e la sostanza sgassata. Si regola poi la pressione sul valore più basso tra quelli prescelti e si aziona il sistema di riscaldamento. Contemporaneamente, la termocoppia od il termometro a resistenza vengono collegati ad un registratore. Si raggiunge l'equilibrio quando si può desumere una temperatura di ebollizione costante per una data temperatura costante. Dopo aver registrato il punto di equilibrio così raggiunto si regola la pressione su un valore più elevato. Questa procedura va ripetuta fino a raggiungere una pressione di 10^5 (per un totale da 5 a 10 punti di misura). A titolo di controllo, la determinazione dei punti di equilibrio deve essere ripetuta a pressioni decrescenti.

1.6.2. *Misura statica*

1.6.2.1. Apparecchiatura

Un tipico apparecchio di misura (vedi figura 2) è formato da un sistema di riscaldamento e di refrigerazione realizzato in vetro e metallo, atto a portare il campione alla temperatura desiderata, nonché degli strumenti per regolare e misurare la pressione e la temperatura.

La camera per il campione è collegata da una parte con una valvola per alto vuoto in acciaio inossidabile e, dall'altra, con un tubo ad U contenente un opportuno fluido manometrico. L'altro ramo del tubo ad U è unito ad un giunto a croce, un braccio del quale è collegato con la pompa da vuoto, un altro con la bombola d'azoto ed il terzo con il manometro.

Per portare la sostanza ad una temperatura prestabilita, l'intera camera del campione, compreso il corpo della valvola ed una porzione abbastanza grande del tubo ad U (in pratica fino all'altezza del corpo della valvola) viene posta in un opportuno bagno a temperatura costante. La temperatura viene misurata con una termocoppia o con un termometro a resistenza in un punto molto prossimo all'esterno della camera del campione e può essere registrata.

Per l'ultraraffreddamento del campione possono venire impiegati azoto liquido oppure una miscela di ghiaccio secco in alcool. Per misure a bassa temperatura si impiega un ultracriostato.

Si usa una pompa adeguata per portare l'apparecchio al grado di vuoto necessario.

La tensione di vapore di una sostanza viene generalmente misurata indirettamente attraverso un indicatore di zero. Tale indicatore può essere costituito da un tubo ad U contenente un liquido, come descritto in seguito, o, tra gli altri, anche un manometro a membrana. La tensione di vapore sposta dalla posizione di equilibrio il liquido nel tubo ad U, trovandosi il tutto in un bagno termostatico. Dalla bombola collegata all'apparecchiatura si fa entrare azoto attraverso una valvola allo scopo di controbilanciare l'effetto della tensione di vapore e riportare così il manometro a zero. La pressione di azoto necessaria a tal fine viene letta su un manometro di precisione, che si trova a temperatura ambiente, e coincide con la tensione di vapore della sostanza alla corrispondente temperatura prefissata. Vari liquidi, come mercurio, oli di silicone o ftalati, possono essere utilizzati a seconda dell'intervallo di pressione e del comportamento chimico della sostanza.

Il mercurio si impiega per pressioni comprese tra quella atmosferica e 10^2 Pa; gli oli di silicone e gli ftalati anche al di sotto di 10^2 Pa fino a 10 Pa; il manometro a membrana può essere inoltre utilizzato fino a 10^{-1} Pa ed oltre.

1.6.2.2. Procedimento di misura

Prima della misura tutte le parti dell'apparecchio illustrato nella figura 2 devono essere pulite a fondo con opportuni solventi e, quindi, asciugate sotto vuoto. Il tubo ad U viene poi riempito con il liquido prescelto, preliminarmente sgassato a temperatura elevata prima del riempimento.

Dopo averlo riempito con la sostanza in esame, l'apparecchio viene montato e la camera del campione raffreddata ad una temperatura sufficientemente bassa. Quindi, con la valvola sovrastante la camera del campione in posizione aperta, si evacua con la pompa l'aria contenuta nell'apparecchio per alcuni minuti. Si chiude poi la valvola sovrastante la camera della sostanza, si porta il campione alla temperatura prescelta e, durante ciò, si osservano gli spostamenti della colonna, azzerando con azoto se necessario, fino a che non si raggiunga la costanza della temperatura. Si porta nuovamente a temperatura molto bassa la camera del campione. Se in queste condizioni di ultraraffreddamento si nota una pressione residua, ciò può essere dovuto all'aria contenuta nel campione, che deve essere eliminata, oppure alla temperatura di raffreddamento non sufficientemente bassa. In questo caso, bisogna impiegare azoto liquido come refrigerante.

Dopo aver sgassato a sufficienza il campione, si determina la dipendenza della tensione di vapore dalla temperatura per intervalli di quest'ultima abbastanza ristretti.

1.6.3. *Isoteniscopio*

Una descrizione completa del metodo è reperibile in letteratura (2). Il principio dell'apparecchio di misura e illustrato nella figura 3.

Analogamente al metodo statico descritto al punto 1.6.2, l'isoteniscopio si presta all'esame di solidi e liquidi.

Nel caso dei liquidi, la sostanza in esame serve essa stessa da fluido nel manometro ausiliario. Nel caso dei solidi, a seconda dell'intervallo di pressione e di temperatura, vanno impiegati i liquidi manometrici elencati al punto 1.6.2. Per sostanze liquide, la sfera dell'isoteniscopio viene riempita con la sostanza da determinare, che va poi sgassata a temperatura elevata durante l'ebollizione.

Contemporaneamente, una parte del liquido contenuto nella sfera distilla e si condensa nella sfera superiore refrigerata, ritornando poi nel tubo ad U. Quando questo è sufficientemente pieno del liquido sgassato, la sfera inferiore con il tubo ad U viene portata alla temperatura prescelta tramite un bagno termostatico, e la tensione di vapore che ne risulta si misura indirettamente esattamente come indicato nel metodo descritto al punto 1.6.2.

Nel caso dei solidi, il liquido manometrico sgassato va posto nella bolla sul braccio lungo dell'isoteniscopio. Si introduce poi il solido in esame nella sfera inferiore e lo si sgassa a temperatura elevata. Successivamente si inclina l'isoteniscopio in modo che il fluido manometrico possa defluire nel tubo ad U. La misura della tensione di vapore in funzione della temperatura viene effettuata come indicato al punto 1.6.2.

1.6.4. *Bilancia a tensione di vapore*

1.6.4.1. Apparecchiatura

In letteratura (1) sono riportati diversi schemi dello strumento. Il modello qui descritto ne illustra i principi operativi. Alcune parti dell'apparecchio sono mostrate nella figura 4. Esse sono la piattaforma di base e la campana, la pompa con vacuometro e la strumentazione per misurare le tensione di vapore mediante la deflessione di un indice.

Sulla piattaforma di base è installato l'equipaggiamento qui descritto:

- un forno evaporatore provvisto di flangia ad alimentazione rotativa. Il forno evaporatore è costituito da un recipiente piatto e cilindrico in rame (il forno può anche essere in vetro, circondato da una parete di rame). Esso è alloggiato su di un supporto di rame, avvitato per il bordo sporgente inferiore ad un sostegno in acciaio inossidabile. Quest'ultimo a sua volta è montato sulla piattaforma di base per mezzo di una flangia, così da poter essere ruotato intorno all'asse del forno. Il riscaldamento è assicurato da una resistenza collocata all'interno del sostegno di acciaio inossidabile, e pertanto esclusa dalla camera sotto vuoto;
- un coperchio in rame per il forno, provvisto di tre aperture di varia sezione per l'evaporazione, disposte a 90 gradi l'una rispetto all'altra. Ruotando il forno, l'apertura prescelta, od una posizione intermedia, può essere portata in corrispondenza della fessura sul refrigerante, disposta eccentricamente rispetto al forno, orientando così il fascio molecolare verso il piatto della bilancia, oppure deviandolo da esso. Una termocoppia od un termometro a resistenza sono collocati sulla parete del forno per poter effettuare le misure di temperatura;
- una bilancia a spirale mobile. L'indice è sostituito da un piccolo tubo sul quale sono montati il giogo della bilancia ed un contrappeso. Il giogo della bilancia è provvisto di un piatto asportabile, ricavato da una sottile lamina di alluminio placcata d'oro. Approssimativamente al centro del giogo è connesso un filo di costanza da 0,1 mm di spessore, sul quale possono essere collocati i pesi per la taratura La tensione di vapore puo essere registrata impiegando uno strumento fotoelettrico di zero;

— un recipiente di ottone che circonda il piatto della bilancia da tutti i lati, ad eccezione di due fessure per il movimento del giogo della bilancia, ed una stretta apertura per l'entrata del fascio molecolare. Il calore viene disperso verso l'esterno tramite una sbarra di rame posta sul recipiente di ottone, ed è convogliato attraverso un tubo d'acciaio inossidabile passante attraverso la piattaforma di base, dalla quale è isolato termicamente. La sbarra è immersa in un Dewar contenente azoto liquido e collocato sotto la piattaforma di base.

1.6.4.2. Procedimento di misura

Il forno di rame viene riempito con la sostanza, il coperchio chiuso, e l'orifizio della piattaforma, la piastra ed il refrigerante fatti scorrere sopra il forno. Si monta la campana e si azionano le pompe da vuoto. La pressione finale prima dell'inizio delle misure deve essere di circa 10^{-4} Pa. Il raffreddamento del recipiente va iniziato a partire da 10^{-2} Pa.

Dopo un certo tempo, la bilancia avrà raggiunto una temperatura abbastanza bassa perché il getto di vapore effluente possa condensarsi sul piatto della bilancia. Tale condensazione genera un segnale sul registratore collegato. Tale segnale può essere utilizzato in due modi: nel caso particolare dell'apparecchio qui descritto, la tensione di vapore viene determinata direttamente in base alla pressione sul piatto della bilancia (la massa molecolare non è necessaria). Contemporaneamente si determina la massa condensata e si può perciò calcolare la velocità di evaporazione in base al tempo di condensazione. Questo metodo si usa con apparecchiature più semplici. La tensione di vapore può anche essere calcolata in base alla velocità di evaporazione e alla massa molecolare, impiegando l'equazione di Herz:

$$p = G \sqrt{\frac{2 \pi RT \times 10^3}{M}}$$

dove:

G = velocità di evaporazione ($kg/s{\cdot}m^2$),

M = massa molecolare (g/mole),

T = temperatura (K),

R = costante universale dei gas (J/mole·K),

p = tensione di vapore (Pa).

Una volta raggiunto il grado di vuoto prestabilito, si inizia la serie delle misure a partire dalla temperatura più bassa. Si apre l'opportuno orifizio ed il getto di vapore oltrepassa la piastra montata direttamente sopra il coperchio e colpisce quindi il piatto refrigerato della bilancia. Quest'ultimo è dimensionato in modo da permettere la raccolta dell'intero getto di vapore nella sua distribuzione cosinusoidale. Il momento del getto di vapore genera una forza che si trasmette al piatto della bilancia, sulla superficie refrigerata della quale ha luogo la condensazione. Il getto del vapore fa deviare il giogo della bilancia dalla sua posizione di equilibrio. All'estremità del giogo della bilancia si trova una linguetta allineata otticamente attraverso un sistema di prismi e di due fotoidi. Un circuito di controllo opportunamente collegato riporta istantaneamente il giogo sbilanciato nella posizione di equilibrio. Si registra il valore del momento torcente necessario che, valutato mediante un'opportuna taratura con pesi, corrisponde alla tensione di vapore della sostanza.

Per le misure successive, si aumenta la temperatura di piccole quantità, fino a raggiungere il massimo desiderato. Il campione viene quindi raffreddato nuovamente e si può registrare una seconda curva di tensione di vapore. Le due serie saranno riproducibili soltanto se il campione in esame e adeguatamente puro. Se la terza prova non conferma i risultati della seconda, è possibile che la sostanza si decomponga nell'intervallo di temperatura entro il quale si effettuano le prove.

1.6.5. *Metodo della saturazione del gas*

1.6.5.1. Apparecchiatura

Una tipica strumentazione in uso per eseguire queste misure comprende un certo numero di componenti, illustrati nella figura 5, e qui appresso descritti (1).

Gas inerte:

Il gas trasportatore non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame. Per tale scopo è in genere sufficiente l'azoto, ma talvolta possono essere necessari altri gas. Il gas impiegato deve essere secco (vedi figura 5 numero 4: Elemento sensibile per l'umidità relativa).

Controllo del flusso:

per assicurare un flusso costante e regolabile del gas attraverso la colonna del saturatore va impiegato un adatto sistema di controllo.

Condensatori di raccolta del vapore:

I condensatori da impiegare dipendono dalle caratteristiche del particolare campione e dal metodo di analisi prescelte. Il vapore deve essere condensato quantitativamente ed in una forma che ne consenta la successiva analisi. Per talune sostanze saranno adatti condensatori contenenti liquidi, quali l'esano od il glicol etilenico. Per altre sostanze possono esssere impiegati adsorbenti solidi.

Scambiatore di calore:

Per misure a temperature diverse, può essere necessario includere nella strumentazione uno scambiatore di calore.

Colonna di saturazione:

La sostanza in esame, sotto forma di soluzione, viene distribuita su di un adatto supporto inerte. Il supporto così ricoperto viene introdotto nella colonna di saturazione, le cui dimensioni così come la velocità di flusso del gas trasportatore devono essere tali da assicurare una completa saturazione di quest'ultimo. La colonna di saturazione va termostatata. Per misure al di sopra dei 20 °C la zona compresa tra la colonna del saturatore ed i dispositivi di condensazione del vapore deve essere riscaldata in modo da evitare la condensazione della sostanza in esame.

1.6.5.2. Procedimento di misura

Preparazione della colonna di saturazione:

Una soluzione della sostanza in esame in un solvente altamente volatile viene aggiunta ad un'adeguata quantità di supporto. Si deve impiegare una sufficiente quantità di sostanza per mantenere la saturazione per tutta la durata della prova. Si evapora completamente il solvente, in aria o mediante un evaporatore rotante, e si introduce nella colonna di saturazione il materiale ben miscelato. Dopo aver regolato il termostato, si fa passare azoto secco attraverso l'apparecchio.

Misure:

I condensatori sono collegati alla linea di efflusso della colonna e si registra il tempo. Si controlla la velocità di flusso all'inizio dell'esperimento ed a intervalli regolari durante il suo svolgimento impiegando un contabolle (od in modo continuo con un flussimetro di massa).

Si misura la pressione all'uscita in direzione della colonna di saturazione. Ciò può essere fatto sia

a) inserendo un manometro tra la colonna di saturazione ed il condensatore (questo a causa del maggior spazio morto e della maggiore superficie adsorbente),

   sia

b) determinando la caduta di pressione attraverso il particolare sistema di condensazione impiegato in funzione della velocità di flusso, eseguendo una determinazione a parte (questo metodo può essere non molto soddisfacente per i condensatori a liquido).

Il tempo richiesto per raccogliere la quantità di sostanza necessaria per i vari metodi di analisi viene determinato mediante prove preliminari o stimato per calcolo. Prima di calcolare la tensione di vapore ad una data temperatura, vanno eseguite prove preliminari per stabilire la velocità di flusso massima ancora capace di saturare completamente il gas di trasporto con il vapore della sostanza. Ciò viene assicurato se il gas di trasporto passa attraverso la colonna di saturazione tanto lentamente che una velocità ancora minore non conduce alla misura di una tensione di vapore superiore.

Il metodo analitico specifico (ad esempio gascromatografia o gravimetria) verrà scelto in funzione della sostanza in esame.

Si determina la quantità di sostanza trasportata da un volume noto di gas di trasporto.

1.6.5.3. Calcolo della tensione di vapore

La tensione di vapore si calcola in base alla densità di vapore, W/V, mediante l'equazione:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

dove:

P = tensione di vapore (Pa),

W = massa di sostanza adsorbita (g),

V = volume di gas saturato (m^3),

R = costante universale morale dei gas (J/mole · K),

T = temperatura (K),

M = massa molare (g/mole).

I volumi misurati vanno corretti per tenere conto delle differenze di temperatura e di pressione tra il flussimetro e la colonna di saturazione termostatata. Se il flussimetro si trova a valle del condensatore del vapore, possono essere necessarie correzioni che tengano conto degli eventuali prodotti di evaporazione provenienti da esso (1).

2. DATI

La tensione di vapore misurata mediante uno qualunque dei metodi precedenti deve essere determinata per almeno due temperature. Tre o più temperature diverse nell'intervallo da 0 a 50 °C sarebbero preferibili per verificare la linearità della curva di tensione di vapore.

3. RELAZIONE

Nella relazione devono essere riportate, se possibile, le seguenti informazioni:

— indicazione precisa della sostanza (identità ed impurezze),

almeno due valori della tensione di vapore a due temperature, di preferenza nell'intervallo compreso tra 0 °C e 50°C. Devono inoltre essere inclusi tutti i dati originali, nonché una curva del valore di log p in funzione di 1/T. In più, va riportata la tensione di vapore stimata a 20 °C o 25 °C.

Qualora si osservi una transizione (cambiamento di stato, decomposizione), saranno fornite le informazioni seguenti:

— la natura del cambiamento,

— la temperatura a cui il cambiamento si verifica sotto la pressione atmosferica,

— la tensione di vapore a 10 °C e a 20 °C al di sotto della temperatura di transizione, nonché a 10 °C e a 20 °C al di sopra di tale temperatura (a meno che la transizione non consista in un passaggio dallo stato solido allo stato gassoso).

Devono essere riportate tutte le informazioni e le osservazioni significative ai fini dell'interpretazione dei risultati.

Deve essere menzionato il metodo impiegato.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104 – Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104.ref (4) – Decision of the Council C (81) 30 Final.

Appendice

Figura 1

Apparecchio per la determinazione della curva di tensione di vapore mediante il metodo dinamico

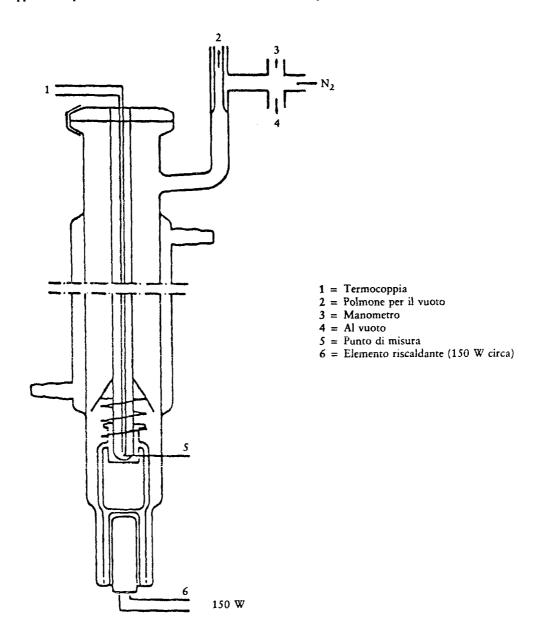



Figura 2

Apparecchio per la determinazione della curva di tensione di vapore mediante il metodo statico

1 = Manometro
2 = Al vuoto
3 = Campione

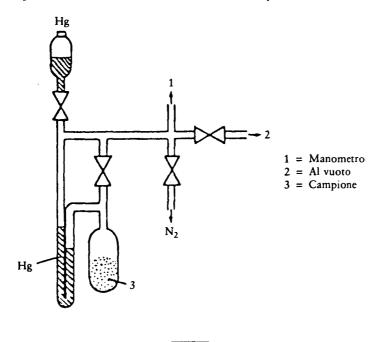



Figura 3

Isoteniscopio

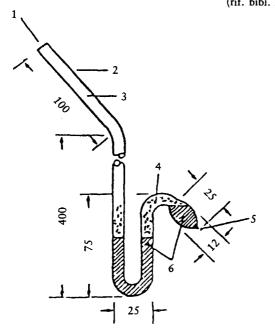
(rif. bibl. 2)

1 = Sistema di controllo e di misura della pressione
2 = Tubo da 8 mm di diametro esterno
3 = Azoto secco nel sistema di pressione
4 = Vapore del campione
5 = Estremo inferiore
6 = Campione liquido

Figura 4

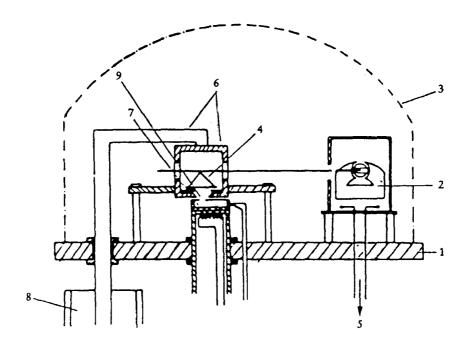
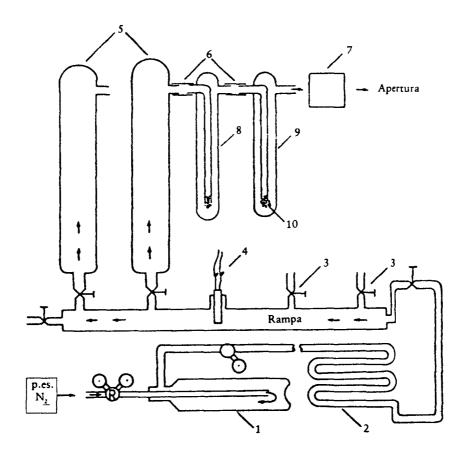
Apparecchio per la determinazione della curva di tensione di vapore mediante il metodo della bilancia

1 = Piattaforma di base
2 = Strumento a spirale mobile
3 = Campana
4 = Bilancia e relativo piatto
5 = Vacuometro
6 = Recipiente refrigerante e sbarra di raffreddamento
7 = Forno evaporatore
8 = Dewar contenente azoto liquido
9 = Piastra

Figura 5

Esempio di sistema di flusso per la determinazione della tensione di vapore mediante il metodo della saturazione gassosa

1 = Regolatore di flusso
2 = Scambiatore di calore
3 = Valvola a spillo
4 = Elemento sensibile per l'umidità relativa
5 = Colonne di saturazione
6 = Giunti in teflon
7 = Flùssimetro
8 = Condensatore per il vapore (adsorbente)
9 = Condensatore ad olio
10 = Gorgogliatore in vetro sinterizzato

A. 5. TENSIONE SUPERFICIALE

1. METODO

I metodi descritti si basano sulle linee direttrici OCSE (1).

1.1. Introduzione

I metodi qui illustrati si applicano alla misura della tensione superficiale di soluzioni acquose.

Prima di effettuare le prove, è utile disporre di dati preliminari su alcune caratteristiche della sostanza in esame, quali la solubilità in acqua, la struttura, il comportamento all'idrolisi e la concentrazione critica per la formazione delle micelle.

I metodi qui illustrati si applicano alla maggior parte delle sostanze chimiche senza alcuna limitazione rispetto al loro grado di purezza.

La misura della tensione superficiale col metodo del tensiometro ad anello può essere effettuata soltanto su soluzioni acquose con viscosità dinamica inferiore a 200 mPa s circa.

1.2. Definizioni ed unità

Per tensione superficiale si intende l'entalpia libera superficiale per unità di area.

La tensione superficiale si misura in:

N/m (unità SI) oppure in

mN/m (sottomultipli della unità SI);

1 N/m = 10^3 dine/cm,

1 mN/m = 1 dine/cm nel vecchio sistema cgs.

1.3. Sostanze di riferimento

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono essere impiegate essenzialmente per la calibrazione periodica del metodo e per permettere il confronto dei risultati.

Nei riferimenti bibliografici (1) e (2) sono citate varie sostanza di riferimento in grado di coprire un ampio campo di valori della tensione superficiale.

1.4. Principio dei metodi

I metodi si basano sulla misura della massima forza che è necessario esercitare in senso verticale ad una staffa o ad un anello a contatto con la superficie del liquido in esame posto in un recipiente di misura affinché detto liquido si distacchi dalla superficie stessa, ovvero su una lamina che abbia un bordo a contatto con la superficie per sollevare la pellicola che si è formata.

1.5. Criteri di qualità

I metodi descritti permettono misure più precise di quanto possa essere necessario per valutazioni di ordine ambientale.

1.6. Descrizione dei metodi

1.6.1. *Metodo della lamina*

Vedi ISO 304 (Tensioattivi — Determinazione della tensione superficiale attraverso il sollevamento di pellicole liquide).

1.6.2. *Metodo della staffa*

Vedi ISO 304 (Tensioattivi — Determinazione della tensione superficiale attraverso il sollevamento di pellicole liquide).

1.6.3. *Metodo dell'anello*

Vedi ISO 304 (Tensioattivi — Determinazione della tensione superficiale attraverso il sollevamento di pellicole liquide).

1.6.4. *Metodo dell'anello armonizzato secondo l'OCSE*

1.6.4.1. Apparecchiatura

I tensiometri reperibili in commercio risultano adeguati a questo tipo di misura.

Essi consistono nelle parti seguenti:

— tavolo mobile per il campione,

— sistema di misurazione della forza,

— elemento di misura (anello),

— recipiente di misura.

1.6.4.1.1. Tavolo mobile per il campione

Il tavolo mobile per il campione viene usato come piano d'appoggio per il recipiente di misura termostatato contenente la soluzione in esame. Detto tavolo è montato su di un sostegno assieme al sistema di misurazione della forza.

1.6.4.1.2. Sistema di misurazione della forza

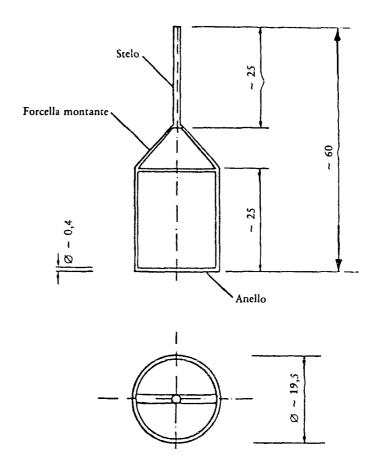
Il sistema di misurazione della forza (vedi figura) è collocato al di sopra del tavolo che sostiene il campione. L'errore nella misura della forza non deve essere maggiore di $\pm$ 10^{-6} N, corrispondente ad un limite di errore di $\pm$ 0,1 mg in unità di massa. Nella maggioranza dei casi la scala di misura dei tensiometri reperibili in commercio è tarata in mN/m, in modo che la tensione superficiale possa essere direttamente letta in mN/m con una accuratezza di 0,1 mN/m.

1.6.4.1.3. Elemento di misura (anello)

L'anello è generalmente costituito da un filo di platino-iridio di circa 0,4 mm di spessore ed avente una circonferenza media compresa tra 20 e 60 mm. L'anello è sospeso orizzontalmente ad uno stelo metallico e ad una forcella montante in filo metallico che costituiscono il collegamento con il sistema di misurazione della forza (vedi figura).

Figura

Elemento di misura

(tutte le quote sono in mm)

1.6.4.1.4. Recipiente di misura

Il recipiente di misura contenente la soluzione in esame deve essere in vetro e permettere la termostatazione. Esso deve essere progettato in modo che, durante la misura, la temperatura della soluzione liquida in esame e della fase gassosa sovrastante la sua superficie rimanga costante e che il campione non possa evaporare. Sono accettabili recipienti cilindrici in vetro di diametro interno non inferiore a 45 mm.

1.6.4.2. Preparazione dell'apparecchiatura

1.6.4.2.1. Pulizia

I recipienti di vetro devono essere accuratamente puliti. Se necessario, essi vanno lavati con misto solfo-cromico bollente, poi con acido fosforico sciropposo (dall'83 al 98 % in peso di H_3PO_4), abbondantemente risciacquati con acqua di rubinetto, lavati con acqua bidistillata fino a reazione neutra, ed infine asciugati o risciacquati con parte del campione liquido in esame.

L'anello deve essere innanzitutto abbondantemente risciacquato con acqua per eliminare ogni sostanza idrosolubile, poi immerso per breve tempo nel misto solfo-cromico, lavato con acqua bidistillata fino a reazione neutra, ed infine riscaldato brevemente su una fiamma a metanolo.

Nota

Eventuali sostanze contaminanti che non possano essere disciolte o distrutte dal misto solfo-cromico o dall'acido fosforico, vanno eliminate mediante un opportuno solvente organico.

1.6.4.2.2. Taratura dell'apparecchio

La calibrazione dell'apparecchiatura consiste nel controllo del punto di zero e nella regolazione dello strumento in modo che esso permetta determinazioni attendibili in mN/m.

Montaggio:

La base dell'apparecchio deve essere posta perfettamente in piano, per esempio utilizzando una livella a bolla d'aria e regolando le apposite viti calate.

Azzeramento dell'apparecchio:

Dopo aver montato l'anello sull'apparecchio e prima di immergerlo nel liquido, il tensiometro va azzerato, controllando inoltre il parallelismo dell'anello con la superficie della soluzione. A tale scopo la superficie della soluzione può essere usata come uno specchio.

Taratura:

La taratura può essere effettuata tramite uno dei due procedimenti seguenti:

a) per mezzo di una massa: il procedimento si basa sull'impiego di cavalieri di massa nota compresa tra 0,1 e 1,0 g, da collocare sull'anello. Il fattore di calibrazione Φ_a, per il quale tutte le letture dell'apparecchio devono essere moltiplicate, va determinato con la seguente equazione (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \quad (1)$$

dove:

$\sigma_r = \frac{m \times g}{2b}$ (mN/m),

m = massa del cavaliere (in g),

g = accelerazione di gravità (981 $cm \cdot s^{-2}$ al livello del mare),

b = circonferenza dell'anello (in cm),

σ_a = lettura al tensiometro dopo collocamento del cavaliere sull'anello (in mN/m);

b) per mezzo dell'acqua: il procedimento si basa sull'impiego di acqua pura, la cui tensione superficiale è nota; per esempio, a 23 °C essa è di 72,3 mN/m. Questo metodo è più rapido della taratura con pesi, ma comporta sempre il rischio che la tensione superficiale dell'acqua risulti alterata a causa della contaminazione con tensioattivi in tracce.

Il fattore di taratura Φ_b, per il quale tutte le letture dell'apparecchio devono essere moltiplicate, va determinato con la seguente equazione (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \quad (2)$$

dove:

σ_o = valore riportato in letteratura per la tensione superficiale dell'acqua (in mN/m),

σ_g = valore misurato della tensione superficiale dell'acqua (in mN/m) (entrambi riferiti alla stessa temperatura).

1.6.4.3. Preparazione dei campioni

Vanno preparate soluzioni acquose delle sostanze da esaminare alle concentrazioni richieste ed in assenza di alcun corpo di fondo.

La soluzione deve essere mantenuta a temperatura costante (± 0,5 °C). Poiché la tensione superficiale di una soluzione nel recipiente di misura varia con il tempo, devono essere effettuate più misure a distanza

l'una dall'altra, in modo da poter tracciare un grafico rappresentante le variazioni della tensione superficiale in funzione del tempo.

Lo stato di equilibrio si considera raggiunto quando non si riscontrano più variazioni.

La polvere e la contaminazione gassosa ad opera di altre sostanza interferiscono con le misure. Queste devono pertanto essere effettuate sotto una copertura di protezione.

1.6.5. *Condizioni sperimentali*

Le misure vanno eseguite a 20 °C circa con variazioni non superiori a ± 0,5 °C.

1.6.6. *Esecuzione della prova*

Il recipiente di misura, accuratamente pulito, va riempito con la soluzione in esame, avendo cura di evitare la formazione di schiuma, e va collocato poi sul tavolo dell'apparecchio. Il piano del tavolo va alzato insieme al recipiente fino ad immergere l'anello sotto la superficie della soluzione in esame. Il piano del tavolo va poi abbassato gradualmente ed uniformemente (ad una velocità di circa 0,5 cm/min), in modo da staccare l'anello dalla superficie, fina a raggiungere il massimo della forza. Lo strato liquido attaccato all'anello non deve separarsi da esso. Al termine della misura, l'anello va nuovamente immerso sotto la superficie della soluzione ed il procedimento ripetuto finché si ottenga un valore costante della tensione superficiale. In ciascuna determinazione va registrato il tempo necessario per trasferire la soluzione nel recipiente di misura. Le letture devono essere effettuate in corrispondenza dello sforzo massimo necessario per distaccare l'anello dalla superficie del liquido.

2. DATI

Per calcolare la tensione superficiale, il valore in mN/m letto sull'apparecchio va innanzitutto moltiplicato per il fattore di calibrazione Φ_a o Φ_b (secondo il procedimento di taratura adottato). Si otterrà così un valore approssimativo σ, che deve essere a sua volta opportunamente corretto.

Harkins e Jordan (3) hanno determinato alcuni fattori di correzioni empirici per i valori della tensione superficiale misurata col metodo dell'anello, i quali dipendono dalle dimensioni dell'anello, dalle densità del liquido e dalla sua tensione superficiale.

Poiché la determinazione del fattore di correzione con le tabelle di Harkins e Jordan per ciascuna singola misura di tensione superficiale risulta troppo laboriosa, per le soluzioni acquose può applicarsi un metodo semplificato, consistente nel desumere la tensione superficiale corretta direttamente dalla tabella qui di seguito riportata. Per valori compresi tra quelli tabulati si può ricorrere ad interpolazione.

TABELLA: CORREZIONE DEI VALORI SPERIMENTALI DELLA TENSIONE SUPERFICIALE

Valida soltanto per soluzioni acquose con $\rho \simeq 1$ g/cm³

R = 9,55 mm (raggio medio dell'anello).

r = 0,185 mm (spessore medio del filo metallico).

Valore sperimentale (mN/m)	Valore corretto (mN/m)	
	Taratura con pesi [vedi punto 1.6.4.2.2, lettera a)]	Taratura con acqua [vedi punto 1.6.4.2.2, lettera b)]
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Questa tabella è stata compilata sulla base della correzione secondo Harkins e Jordan, in modo analogo alla norma DIN 53914 per l'acqua e le soluzioni acquose (densità ρ = 1 g/cm³) e per anelli reperibili in commercio aventi dimensioni di 9,55 mm (R = raggio medio dell'anello) e 0,185 mm (r = spessore del filo metallico). La tabella fornisce i valori corretti per le misure di tensione superficiale effettuate dopo taratura con pesi o con acqua.

In alternativa, la tensione superficiale può essere calcolata senza taratura preliminare ricorrendo alla formula seguente:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4 \pi R}$$

dove:

F = forza misurata al dinamometro al punto di rottura della pellicola,

R = raggio dell'anello,

f = fattore di correzione (1).

3. RELAZIONE

La relazione deve contenere, se possibile, almeno i dati seguenti:

— metodo impiegato (metodo ISO o metodo normalizzato OCSE del tensiometro ad anello);

— tipo di acqua o soluzione impiegata;

— precisa indicazione della sostanza (identità ed impurezze);

— risultati delle singole misure: tensione superficiale (letture), indicando tanto le misure individuali quanto la loro media aritmetica, nonché la media corretta (prendendo in considerazione il fattore specifico dell'apparecchio e la tabella di correzione);

— concentrazione della soluzione;

— temperatura a cui sono state eseguite le determinazioni;

— età della soluzione impiegata, vale a dire il tempo intercorso tra la preparazione della soluzione e le misure;

— descrizione della variazione della tensione superficiale col tempo dopo il trasferimento della soluzione nel recipiente di misura;

— tutte le informazioni ed osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in modo particolare per quel che riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) Pure and Applied Chem, Vol. 48, 1976, p. 511.

(3) Harkins, W. D., Jordan, H. F., J. Amer. Chem. Soc., Vol. 52, 1930, p. 1751.

A. 6. IDROSOLUBILITA

1. METODO

I metodi descritti sono basati sulle linee direttrici OCSE (1).

1.1. **Introduzione**

Per l'esecuzione della prova in oggetto è utile disporre di informazioni preliminari sulla formula di struttura, la tensione di vapore, la costante di dissociazione e l'idrolisi (in funzione del pH) della sostanza in esame.

Non esiste un procedimento unico che sia applicabile a tutto l'intervallo delle solubilità in acqua.

Il metodo non è applicabile alle sostanze volatili.

I due metodi di prova qui di seguito descritti abbracciano l'intera gamma delle solubilità:

— il primo si applica a sostanze essenzialmente pure, scarsamente solubili ($< 10^{-2}$ g/l), e stabili in acqua, e viene definito «metodo della eluizione su colonna»;

— il secondo si applica a sostanze essenzialmente pure con solubilità più elevata ($> 10^{-2}$ g/l), e stabili in acqua, e viene definito «metodo del matraccio».

La solubilità in acqua della sostanza esaminata può essere considerevolmente alterata dalla presenza di impurezze.

1.2. **Definizioni ed unità**

La solubilità in acqua di una sostanza è definita come la concentrazione di saturazione della sostanza in acqua ad una determinata temperatura. La solubilità in acqua è espressa in unità di massa per volume di soluzione. L'unità SI è il kg/m^3 (si può anche far uso del g/l).

1.3. **Sostanze di riferimento**

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono essere impiegate essenzialmente per la calibrazione periodica del metodo e per permettere il confronto dei risultati quando si ricorre ad un altro metodo.

1.4. **Principio del metodo**

Tramite una semplice prova preliminare si stabilisce la quantità approssimativa del campione ed il tempo necessario per raggiungere la concentrazione di saturazione.

1.4.1. *Metodo dell'eluizione su colonna*

Questo metodo si basa sull'eluizione con acqua della sostanza in esame attraverso una microcolonna riempita con materiale di supporto inerte, come perline di vetro, gel di silice o sabbia, ed un eccesso della sostanza stessa. La solubilità in acqua viene valutata quando la concentrazione dell'eluato è costante. Ciò si deduce dal fatto che la concentrazione in funzione del tempo raggiunge un valore costante.

1.4.2. *Metodo del matraccio*

In questo metodo la sostanza (polverizzata, se solida) è disciolta in acqua ad una temperatura leggermente superiore a quella del saggio. Quando si raggiunge la saturazione, la miscela viene raffreddata e mantenuta alla temperatura della determinazione, agitando per tutto il tempo necessario a raggiungere l'equilibrio (2). Successivamente si determina con un opportuno metodo analitico la concentrazione della sostanza nella soluzione acquosa che deve risultare priva di particelle indisciolte.

1.5. **Criteri di qualità**

1.5.1. *Ripetibilità*

Per il metodo della eluizione su colonna la ripetibilità risulta inferiore al 30 %; per il metodo del matraccio essa dovrebbe essere inferiore al 15 %.

1.5.2. *Sensibilità*

La sensibilità dipende dal metodo di analisi; si possono comunque effettuare determinazioni della concentrazione fino a valori di almeno 10^{-6} g/l.

1.6. **Descrizione dei metodi**

1.6.1. *Condizioni di determinazione*

La prova deve essere eseguita preferibilmente a 20 °C ± 0,5 °C. Se si presume che ci sia una dipendenza della solubilità anche dalla temperatura (>3 %/°C), la prova deve essere eseguita ad altre due temperature di almeno 10 °C al di sopra ed al di sotto di quella scelta inizialmente. In questo caso il controllo della temperatura deve rientrare in ± 0,1 °C. La temperatura prescelta deve essere mantenuta costante per tutte le componenti della strumentazione.

1.6.2. *Prova preliminare*

In un cilindro graduato da 10 ml, chiuso con tappo di vetro e contenente all'incirca 0,1 g del campione (le sostanze solide devono essere polverizzate), vengono versati volumi crescenti di acqua distillata a temperatura ambiente, secondo le indicazioni riportate nella seguente tabella:

0,1 g solubili in «x» ml di acqua	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Solubilità approssimativa (g/l)	> 1 000	1 000—200	200—100	100—50	50—10	10—1	< 1

Dopo ciascuna aggiunta delle quantità d'acqua indicate, la miscela viene vigorosamente agitata per 10 minuti e controllata visualmente per accertare la presenza di particelle non disciolte del campione. Se dopo l'aggiunta di 10 ml di acqua il campione, o parte di esso, non si è disciolto, il contenuto del cilindro di misura viene trasferito in un cilindro graduato da 100 ml, che viene poi riempito con acqua e quindi agitato. Per solubilità inferiori, il tempo necessario per sciogliere la sostanza può essere considerevolmente più lungo (si devono prevedere 24 ore). La solubilità approssimativa è indicata nella tabella in corrispondenza del volume di acqua aggiunta, sufficiente per la completa dissoluzione del campione. Se risulta che la sostanza è ancora manifestamente insolubile, va effettuata un'ulteriore diluizione per accertare se si debba usare il metodo della eluizione su colonna od il metodo del matraccio.

1.6.3. *Metodo dell'eluizione su colonna*

1.6.3.1. Materiale di supporto, solvente ed eluente

Il materiale di supporto per il metodo dell'eluizione su colonna deve essere inerte. Possibili materiali adatti allo scopo sono perline di vetro e silice. Per distribuire la sostanza in esame sul materiale di supporto, va utilizzato un opportuno solvente volatile di purezza analitica. Come eluente o solvente va utilizzata acqua bidistillata proveniente da apparecchi in vetro od in quarzo.

Nota

Non deve utilizzarsi acqua proveniente da scambiatore di ioni organico.

1.6.3.2. Caricamento del supporto

Si pesano 600 mg circa del materiale di supporto, che si trasferiscono poi in un pallone a base tonda da 50 ml. Si scioglie nel solvente prescelto una quantità opportuna e pesata della sostanza da esaminare. Si aggiunge al materiale di supporto la quantità necessaria di soluzione della sostanza in oggetto. Il solvente deve essere completamente evaporato, per esempio in evaporatore rotante, altrimenti non si raggiunge la saturazione con acqua del supporto a causa degli effetti di ripartizione sulla sua superficie.

Il caricamento del materiale di supporto può causare problemi (risultati erronei) se la sostanza di prova si deposita sotto forma di olio o di una diversa fase cristallina. Il problema va esaminato sperimentalmente.

Il materiale di supporto così caricato viene lasciato a bagno approssimativamente per 2 ore in circa 5 ml di acqua, e quindi la sospensione viene introdotta nella microcolonna. In alternativa, si può versare il materiale di supporto già ricoperto della sostanza ed essiccato nella microcolonna previamente riempita d'acqua e quindi equilibrata per circa 2 ore.

Procedimento della determinazione:

l'eluizione della sostanza dal materiale di supporto può essere eseguita in due modi diversi:

— con una pompa di circolazione (vedi figura 1),

— con un recipiente di livellamento (vedi figura 4).

1.6.3.3. Metodo dell'eluizione su colonna con pompa di circolazione

Apparecchiatura:

La rappresentazione schematica di un tipico sistema è riportata nella figura 1. La figura 2 presenta una microcolonna di adatte caratteristiche, che peraltro può avere altre misure, purché rispetti i criteri di riproducibilità e sensibilità. La colonna deve comprendere uno spazio di testa pari ad almeno cinque volte il volume del letto d'acqua più un minimo di cinque campioni. In alternativa, le dimensioni possono anche essere ridotte qualora si impieghi un solvente di riempimento per sostituire i primi cinque volumi del letto d'acqua, scartati perché contenenti impurezze.

La colonna deve essere collegata ad una pompa di circolazione capace di assicurare una portata di circa 25 ml/h. La pompa è collegata mediante giunti in teflon e/o in vetro. La colonna e la pompa, dopo il montaggio, devono permettere il campionamento dell'effluente e l'equilibrazione dello spazio di testa a pressione atmosferica. Il materiale della colonna è sostenuto da un batuffolo di lana di vetro (5 mm), che serve anche da filtro per le particelle. La pompa di circolazione può essere per esempio una pompa peristaltica (si deve fare attenzione affinché non ci sia contaminazione e/o adsorbimento da parte del materiale del tubo) od una pompa a membrana.

Procedimento di misura:

Viene avviato il flusso attraverso la colonna. Si raccomanda di utilizzare una velocità di flusso di 25 ml/h circa (per la colonna descritta, approssimativamente 10 volte il volume del letto per ora). Si devono scartare almeno i primi cinque volumi per allontanare le impurezze solubili in acqua. Successivamente la pompa di circolazione si lascia funzionare l'apparecchio fino al raggiungimento dell'equilibrio; ciò viene accertato sulla base dei successivi cinque campioni, le concentrazioni dei quali non differiscono più del ± 30 % con distribuzione casuale. Questi campioni devono essere distanziati l'uno dall'altro da intervalli di tempo corrispondenti al passaggio di almeno dieci volte il volume del letto di eluente.

1.6.3.4. Metodo dell'eluizione su colonna con recipiente di livellamento

Apparecchiatura (vedi figure 3 e 4):

Recipiente di livellamento: il collegamento con il recipiente di livellamento si realizza tramite un giunto di vetro smerigliato, connesso con un tubo in teflon. Si raccomanda una velocità di flusso di circa 25 ml/h. Frazioni eluite consecutivamente vanno prelevate ed analizzate con il metodo prescelto.

Procedimento di misura:

Per determinare la solubilità in acqua si utilizzano frazioni eluite nella fase centrale dove le concentrazioni sono costanti (± 30 %) in almeno cinque frazioni consecutive.

Si deve eseguire una seconda prova con una velocità di flusso uguale alla metà di quella della prima prova. Se i risultati delle due prove concordano, la determinazione è soddisfacente. Se si misura una solubilità manifestamente superiore a quella corrispondente alla velocità di flusso minore, il dimezzamento della velocità di flusso va proseguito finché due prove successive non forniscano lo stesso valore della solubilità.

In entrambi i casi (utilizzando una pompa di circolazione od un recipiente di livellamento), l'eventuale presenza di materia colloidale va controllata tramite l'effetto Tyndall (diffusione della luce). La presenza di tali particelle toglie validità ai risultati e pertanto si deve ripetere la determinazione migliorando l'azione filtrante della colonna. Va registrato il pH di ogni campione. Una seconda prova deve essere eseguita alla stessa temperatura.

1.6.4. *Metodo del matraccio*

1.6.4.1. Apparecchiatura

Per il metodo del matraccio è necessario il seguente materiale:

— normale strumentazione e vetreria di laboratorio,

— un apparecchio adatto per l'agitazione delle soluzioni a temperatura costante e controllata,

— una centrifuga (preferibilmente con termostato), se necessario in presenza di emulsioni,

— apparecchiatura per determinazioni analitiche.

1.6.4.2. Procedimento di misura

La quantità di materiale necessario per saturare il volume prestabilito di acqua viene valutata in base a prove preliminari. Il volume di acqua necessario dipenderà dal metodo analitico e dall'intervallo di solubilità. Una quantità di materiale pari a cinque volte quella indicata sopra viene pesata direttamente in tre recipienti di vetro (per esempio, tubi da centrifuga, beute) provvisti di tappi di vetro. A ciascun recipiente viene aggiunto il volume prescelto di acqua e quindi i recipienti vengono ermeticamente chiusi. Questi sono agitati a 30 °C (si deve utilizzare un apparecchio di agitazione o di mescolamento che funzioni a temperatura costante, per esempio un agitatore magnetico in bagno d'acqua termostato). Dopo un giorno uno dei recipienti viene prelevato e riequilibrato per 24 ore alla temperatura della determinazione, con agitazione intermittente. Il contenuto del recipiente viene poi centrifugato alla temperatura della prova, e si misura con un opportuno metodo analitico la concentrazione del composto nella fase acquosa limpida. Gli altri due recipienti vengono trattati in modo analogo dopo una equilibrazione iniziale a 30 °C per due e tre giorni, rispettivamente. Se i valori di concentrazione concordano nei limiti richiesti per la riproducibilità almeno per i due ultimi campioni, la prova è positiva. Se invece i dati relativi ai recipienti 1, 2 e 3 mostrano una tendenza verso valori crescenti, l'intera prova deve essere ripetuta, utilizzando tempi di equilibrazione più lunghi.

Va riportato il pH di ciascun campione.

1.6.5. *Analisi*

Per queste determinazioni va preferito un metodo analitico specifico per la sostanza in esame, poiché piccole quantità di impurezze solubili possono causare forti errori nella misura della solubilità. Esempi di tali metodi sono la gascromatografia, la cromatografia liquida, procedimenti di titolazione, procedimenti fotometrici, procedimenti voltametrici.

2. DATI

2.1. Metodo dell'eluizione su colonna

Per ciascuna prova si deve calcolare il valore medio di almeno cinque campioni consecutivi prelevati in corrispondenza della fase di costanza di saturazione, nonché la deviazione standard.

2.2. Metodo del matraccio

Si devono riportare i singoli risultati per ciascuno dei tre matracci, e si deve calcolare la media dei risultati giudicati costanti (ripetibilità inferiore al 15 %); essa va espressa in unità di massa per volume di soluzione. Ciò può richiedere la conversione delle unità di massa in unità di volume, utilizzando la densità quando la solubilità sia molto elevata (> 100 g/l).

3. RELAZIONE

3.1. Metodo della eluizione su colonna

La relazione deve contenere, se possibile, un'indicazione dei risultati della prova preliminare, oltre alle informazioni seguenti:

- indicazione precisa della sostanza (identità ed impurezze);
- le singole concentrazioni, le velocità di flusso ed il pH di ciascun campione;
- le medie e le deviazioni standard di almeno cinque campioni al valore costante di saturazione per ciascuna prova;
- la media delle due prove successive accettabili;
- la temperatura dell'acqua durante il processo di saturazione;
- il metodo di analisi utilizzato;
- la natura del materiale di supporto utilizzato;
- il procedimento di carica del materiale di supporto;
- il solvente utilizzato;
- menzione di ogni instabilità chimica della sostanza durante la prova ed il metodo utilizzato,
- ogni informazione utile per l'interpretazione dei risultati.

3.2. Metodo del matraccio

La relazione deve fornire, se possibile, le seguenti informazioni:

- indicazione precisa della sostanza (identità ed impurezze);
- le singole determinazioni analitiche e la media nel caso in cui più di un valore sia stato determinato per ciascun matraccio;
- il pH di ciascun campione;
- la media dei valori per i diversi matracci, i cui risultati siano concordanti;
- la temperatura di determinazione;
- il metodo analitico utilizzato;
- menzione di ogni instabilità chimica della sostanza durante la prova ed il metodo utilizzato;
- ogni informazione utile per l'interpretazione dei risultati.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 116 — Decision of the Council C (81) 30 Final.

Appendice

Figura 1

Rappresentazione schematica della determinazione

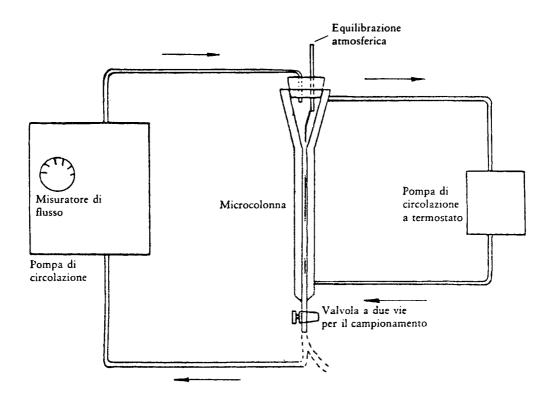



Figura 2

Microcolonna tipica
(Tutte le quote sono in mm)

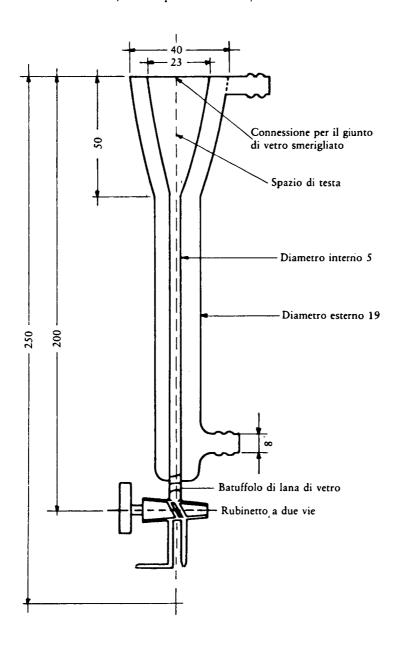



Figura 3

Microcolonna tipica
(tutte le quote sono in mm)

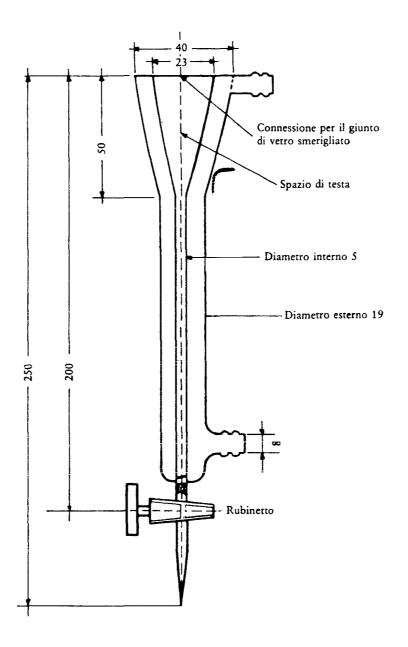
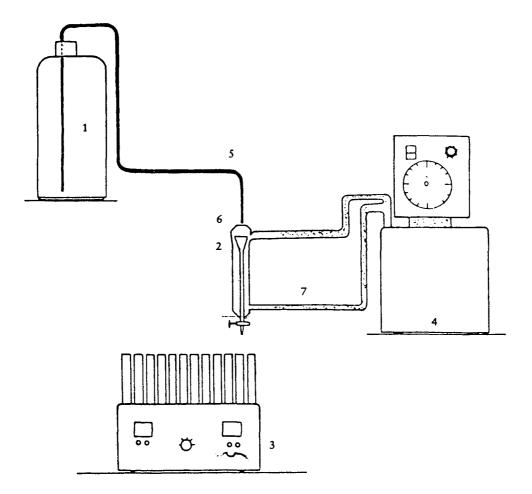



Figura 4

Dispositivo sperimentale per la determinazione della solubilità in acqua di sostanze con limitata solubilità e bassa volatilità

1 = Recipiente di livellamento (per esempio bottiglia da 2,5 litri)
2 = Colonna (vedi figura 3)
3 = Collettore di frazioni
4 = Termostato
5 = Tubo in teflon
6 = Tappo di vetro
7 = Tubi per l'acqua (tra il termostato e la colonna, diametro interno: 8 mm circa)

A. 7. LIPOSOLUBILITA

1. METODO

Il metodo descritto è basato sulle linee direttrici OCSE (1).

1.1. Introduzione

Per l'esecuzione della prova in oggetto è utile disporre di informazioni preliminari sul coefficente di ripartizione, sulla solubilità in acqua, sulla formula di struttura e sulla stabilità della sostanza a 50 °C. Questo metodo è applicabile soltanto a sostanze essenzialmente pure, stabili a 50 °C, e non apprezzabilmente volatili sotto queste condizioni.

Il metodo non è applicabile a sostanze che reagiscano con i trigliceridi.

1.2. Definizioni ed unità

Per solubilità nei grassi si intende la frazione di massa di una sostanza che forma una fase omogenea con un grasso liquido (olio), senza dar luogo a reazioni chimiche. Il valore massimo di tale frazione di massa è denominato frazione di massa di saturazione, ed è funzione della temperatura.

La frazione di massa di saturazione deve essere riportata in mg/100 g di grasso standard a 37 °C ± 0,5 °C.

Tra solubilità in g per 100 g di soluzione (S') e solubilità in g per 100 g di solvente (S) è valida la relazione seguente:

$$S = \frac{100 \times S'}{100 - S'} \text{ g/100 g di grasso standard}$$

Moltiplicando per 1 000 il valore S si ottiene il valore espresso in mg/100 g di grasso standard.

1.3. Sostanza di riferimento

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono essere impiegate essenzialmente per la calibrazione periodica del metodo e per permettere il confronto dei risultati quando si ricorre ad un altro metodo.

1.4. Principio del metodo

Si aggiunge la sostanza ad un «grasso standard» liquido e la si mescola. La sostanza viene aggiunta in una quantità tale da assicurarne l'eccesso. La quantità disciolta si della sostanza in esame deve essere determinata con un idoneo metodo analitico.

1.5. Criteri di qualità

1.5.1. *Specificità*

Attualmente non si conosce la ripetibilità della determinazione.

I risultati devono applicarsi a grassi standard e sono idonei per sostanze essenzialmente pure. Anche a 37 °C i grassi possono formare emulsioni o sospensioni fini di sostanze solide. Poiché queste sono suscettibili di interferire nella successiva determinazione della frazione di massa, la loro formazione deve essere evitata.

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. *Preparazione*

1.6.1.1. Apparecchiatura

Sono necessarie le seguenti attrezzature:

— normale vetreria di laboratorio,

— bilancia,

— centrifuga con termostato,

— un miscelatore che possa essere utilizzato assieme ad un sistema di controllo della temperatura,

— termostato.

1.6.1.2. Grassi standard

E necessario l'uso di grassi standard. Essi devono essere facilmente definibili; un esempio di grasso standard è riportato in appendice.

1.6.1.3. Prova preliminare

Si esegue una prova preliminare semplificata per stabilire la quantità approssimativa di sostanza necessaria per arrivare alla frazione di massa di saturazione alla temperatura della determinazione (37 °C).

Nota

Nel caso di sostanze solide, la velocità di raggiungimento dell'equilibrio di saturazione può dipendere in modo notevole dalle dimensioni delle particelle. Per questo motivo, tali sostanze vanno polverizzate.

1.6.1.4. Preparazione della sostanza

Si pesano otto campioni in beute da 50 ml. Normalmente ciascun campione deve essere pari al doppio del quantitativo necessario per la saturazione quale lo si è determinato nella prova preliminare.

Dopo aver aggiunto una quantità pesata di circa 25 g di grasso standard liquefatto e miscelato, le beute, collegate agli agitatori, vengono ermeticamente chiuse con tappi di vetro smerigliato. Si agita la metà dei campioni (gruppo 1) a 30 °C per almeno un'ora, e l'altra metà (gruppo 2) a circa 50 °C per lo stesso periodo di tempo.

1.6.2. *Condizioni di prova*

La determinazione della solubilità viene eseguita a 37 °C ± 0,5 °C.

1.6.3. *Procedimento di misura*

Si agita il contenuto delle beute di entrambi i gruppi a 37 °C ± 0,5 °C, fino a miscelazione completa.

In generale, il tempo di agitazione necessario per arrivare all'equilibrio non può essere previsto. Nel caso di sostanze liquide, la saturazione può essere raggiunta entro pochi minuti; nel caso di sostanze solide, possono essere necessarie alcune ore. Di solito non si dovrà ricorrere a più di tre ore di agitazione; dopo questo periodo di tempo si deve interrompere l'agitazione per due beute, ciascuna prelevata da uno dei due gruppi, che resteranno in riposo per almeno un'ora a 37 °C per consentire la separazione della quantità indisciolta di sostanza e la formazione della fase omogenea. Qualora si formino emulsioni o sospensioni (evidenziabili per esempio tramite l'effetto Tyndall), queste vanno eliminate con un opportuno metodo, quale la centrifugazione termostatica.

La terza e la quarta beuta di entrambi i gruppi devono essere agitate per almeno 24 ore, prima di lasciarle riposare per un'ora a 37 °C ± 0,5 °C.

Nota

Se dopo questo periodo di tempo non si è formato alcun sedimento sul fondo (per le sostanze solide) o non si è verificata alcuna separazione di fase (per le sostanze liquide), la prova deve essere ripetuta con una quantità maggiore di sostanza.

1.6.4. *Analisi*

Da ciascuna fase del grasso saturato viene prelevato un campione per l'analisi. Il campione viene pesato e se ne determina la frazione di massa.

Si può far uso di un qualunque metodo analitico adatto, sia direttamente che dopo estrazione con acqua oppure con un solvente organico, o con qualsiasi altra tecnica di separazione.

Esempi di tali metodi sono:

— spettrofotometria;

— gascromatografia o cromatografia liquida;

— voltametria.

2. DATI

Se vi sono differenze significative nei risultati, causate da sottosaturazione o soprasaturazione oppure da intervalli di tempo insufficienti o eccessivi, la determinazione va ripetuta con tempi più lunghi di agitazione.

3. RELAZIONE

Nella relazione devono essere riportate, se possibile, le seguenti informazioni:

— indicazione precisa della sostanza (identità ed impurezze);

— indicazione precisa del grasso (per esempio, descrizione, caratteristiche, origine, composizione);

— metodo di analisi, variazioni ed aspetti particolari.

I risultati devono essere valutati come descritto in precedenza e devono essere riportati nella relazione sulla determinazione. Se non sono state riscontrate differenze significative tra i vari valori osservati in mg per 100 g devono essere indicati i singoli valori, il valore medio e la deviazione standard. Se sono state rilevate differenze non trascurabili anche dopo la seconda prova, vanno indicati solo i singoli risultati;

— devono essere fornite tutte le informazioni e le osservazioni necessarie per l'interpretazione dei risultati.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 116. Decision of the Council C (81) 30 Final.

Appendice

ESEMPIO DI GRASSO STANDARD

La seguente tabella indica la composizione di un tipico grasso standard.

Distribuzione degli acidi grassi

Numero di atomi di carbonio nella parte costituita dagli acidi grassi	6	8	10	12	14	16	18	altri
Aree GLO (%)	0,5	7,5	10,3	50,4	13,9	7,6	8,6	1

Distribuzione dei gliceridi

Numero totale di atomi di carbonio nella parte costituita dagli acidi grassi	22	24.	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
Aree GLC (%)	0,1	0,3	1,0	2,3	4,9	10,9	13,9	21,1	16,1	11,7	9,8	4,4	2,2	1,1	0,2

Purezza

Contenuto di monogliceridi (enzimatico) ≤ 0,1 %

Contenuto di digliceridi (enzimatico) ≤ 0,4 %

Parte insaponificabile ≤ 0,1 %

Numero di Wijs ≤ 0,5

Numero di acidità 0,02

Contenuto in acqua (K. Fischer) ≤ 0,1 %

Punto di fusione limpida 28,5 °C

Spettro di assorbimento caratteristico (spessore dello strato d = 1 cm, riferimento: acqua, 35 °C)

Lunghezza d'onda (nm)	290	310	330	350	370	390	430	470	510
Trasmittanza (%)	2	15	37	64	80	88	95	97	98

Almeno 10 % della trasmittanza della luce a 303 nm.

Questo simulatore di grasso è una miscela sintetica di trigliceridi saturi con una distribuzione di acidi grassi e trigliceridi simile a quella del grasso di noce di cocco.

A. 8. COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE

1. METODO

Il metodo descritto è basato sulle linee direttrici OCSE (1).

1.1. Introduzione

È utile disporre di informazioni preliminari sulla costante di dissociazione, sulla solubilità in acqua e sulla tensione superficiale della sostanza.

Il metodo si applica soltanto a sostanze essenzialmente pure, solubili in acqua ed ottanolo. Esso non può essere usato per sostanze tensioattive.

1.2. Definizioni ed unità

Il coefficiente di ripartizione (P) si definisce come il rapporto tra le concentrazioni all'equilibrio (c_i) di una sostanza disciolta in un sistema bifasico costituito da due solventi pressoché immiscibili.

Nel caso del *n*-ottanolo e dell'acqua:

$$P_{oa} = \frac{c_{ottanolo}}{c_{acqua}}$$

Il coefficiente di ripartizione (P) è pertanto il quoziente di due concentrazioni, e viene generalmente espresso sotto forma del suo logaritmo decimale (log P).

1.3. Sostanze di riferimento

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono essere impiegate essenzialmente per la calibrazione periodica del metodo e per permettere il confronto dei risultati quando si ricorre ad un altro metodo.

1.4. Principio del metodo

Per determinare un coefficiente di ripartizione è necessario raggiungere l'equilibrio di interazione tra tutti i componenti del sistema, e si devono quindi misurare le concentrazioni della sostanza disciolta nelle due fasi. Da un esame della letteratura sull'argomento risulta che molte tecniche sono disponibili per risolvere il problema di una miscelazione completa delle due fasi e della loro successiva separazione per poter determinare la concentrazione all'equilibrio della sostanza da esaminare.

1.5. Criteri di qualità

1.5.1. *Ripetibilità*

Per assicurare la precisione del coefficiente di ripartizione, vanno eseguite determinazioni in doppio sotto tre diverse condizioni sperimentali, così da poter variare la quantità della sostanza considerata nonché il rapporto tra i volumi dei solventi. I valori determinati per il coefficiente di ripartizione, espressi come logaritmi decimali, devono essere compresi in un intervallo di ± 0,3 unità logaritmiche.

1.5.2. *Sensibilità*

L'intervallo di misura del metodo è condizionato dal limite di rivelabilità del procedimento analitico. Questo deve essere sufficiente per permettere la valutazione di P_{oa} fino a 10^5 quando la concentrazione del soluto in una delle due fasi non è superiore a 0,01 moli/l.

1.5.3. *Specificità*

La legge di ripartizione di Nernst si applica esclusivamente a soluzioni diluite a temperatura, pressione e pH costanti. Essa è rigorosamente valida solo per una sostanza pura dispersa tra due solventi puri. Qualora in una delle due fasi, od in ambedue, siano presenti più soluti diversi, ciò può alterare i risultati.

La dissociazione o l'associazione delle molecole disciolte portano a deviazioni dalla legge di ripartizione di Nernst. Tali deviazioni sono evidenziate dal fatto che il coefficiente di ripartizione varia in dipendenza della concentrazione della soluzione.

Dati gli equilibri multipli che hanno luogo, questo metodo non può essere applicato a composti ionizzabili senza ricorrere ad opportuni fattori di correzione (per tali composti va preso in considerazione l'uso di soluzioni tampone in luogo dell'acqua).

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. *Valutazione preliminare del coefficiente di ripartizione*

Il valore del coefficiente di ripartizione può essere stimato sia mediante un semplice calcolo (2), sia impiegando le solubilità della sostanza da esaminare nei solventi puri (1).

A tal fine,

$$P_{stimato} = \frac{\text{concentrazione di saturazione}_{n\text{-ottanolo}}}{\text{concentrazione di saturazione}_{\text{acqua}}}$$

In alternativa, esso può essere determinato approssimativamente tramite una prova preliminare semplificata.

1.6.2. *Preparazione*

n-Ottanolo: la determinazione del coefficiente di ripartizione deve essere effettuata con prodotti per analisi di elevata purezza.

Acqua: va impiegata acqua distillata o bidistillata prodotta in apparecchi di vetro o di quarzo.

Nota

Non deve essere fatto uso di acqua prelevata direttamente da uno scambiatore ionico.

1.6.2.1. Presaturazione dei solventi

Prima di determinare il coefficiente di ripartizione, le fasi del sistema di solventi devono essere mutuamente saturate mediante agitazione alla temperatura della determinazione. Per far ciò è vantaggioso agitare per 24 ore con un agitatore meccanico due grandi bottiglie di riserva contenenti rispettivamente *n*-ottanolo ed acqua, entrambi di grande purezza, addizionati ciascuno di una adeguata quantità dell'altro solvente, e poi lasciate riposare abbastanza a lungo da consentire la separazione delle fasi ed il raggiungimento dello stato di saturazione.

1.6.2.2. Preparazione per la determinazione

L'intero volume del sistema bifasico deve riempire quasi completamente il recipiente di misura. Ciò permetterà di evitare le perdite di materiale per volatilizzazione. I rapporti in volume e le quantità delle sostanze da impiegare devono essere stabilite tenendo conto:

— della valutazione preliminare del coefficiente di ripartizione (vedi sopra);

— della quantità minima di sostanza da esaminare per il procedimento analitico;

— della limitazione della concentrazione ad un massimo di 0,01 moli/l per ognuna delle due fasi.

Si eseguono tre determinazioni. Per la prima si fa uso del rapporto di volumi calcolato; per la seconda si aggiunge il doppio del volume di *n*-ottanolo; per la terza la metà del volume di *n*-ottanolo.

1.6.2.3. Sostanza da esaminare

Per la reintegrazione del materiale durante l'esperimento, va preparata una soluzione di riserva di *n*-ottanolo con una concentrazione della sostanza tra 1 e 100 mg/l. L'effettiva concentrazione ponderale di tale soluzione di riserva deve essere determinata con precisione prima del suo impiego per la determinazione del coefficiente di ripartizione. Detta soluzione deve essere conservata in condizioni di stabilità.

1.6.3. *Condizioni sperimentali*

La temperatura della determinazione deve essere mantenuta costante (± 1 °C) ed essere compresa nell'intervallo 20—25 °C.

1.6.4. *Procedimento di misura*

1.6.4.1. Raggiungimento dell'equilibrio di ripartizione

Per ciascuna condizione sperimentale si devono preparare in doppio i recipienti contenenti la quantità richiesta dei due solventi, esattamente misurata, insieme all'opportuna quantità della soluzione di riserva.

Le quantità di ottanolo vanno misurate in volume. I recipienti per la determinazione devono essere collocati in un opportuno agitatore o essere agitati manualmente. Un metodo raccomandato è quello di far ruotare rapidamente di 180 gradi il tubo da centrifuga attraverso il suo asse longitudinale, in modo che tutte le bolle d'aria intrappolate possano venire a galla attraverso le due fasi.

1.6.4.2. Separazione delle fasi

Per separare le fasi, deve essere effettuata una centrifugazione della miscela. Ciò va fatto tramite una centrifuga da laboratorio mantenuta a temperatura ambiente; qualora si impieghi una centrifuga non termostatata, le provette devono essere riequilibrate alla temperatura della determinazione per almeno un ora prima dell'analisi.

1.6.5. *Analisi*

Per la determinazione del coefficiente di ripartizione è necessario misurare la concentrazione della sostanza in esame in ambedue le fasi. Ciò può essere fatto prelevando un'aliquota di entrambi le fasi da ciascuna provetta per ciascuna condizione sperimentale ed analizzandola mediante il procedimento prescelto. La quantità totale delle sostanze presenti in ambedue le fasi deve essere calcolata e confrontata con la quantità della sostanza inizialmente introdotta.

Il prelievo di un campione della fase acquosa va eseguito con un procedimento che renda minimo il rischio di inclusione di tracce di ottanolo; a tal fine si può impiegare una siringa in vetro con ago asportabile. All'inizio la siringa deve essere parzialmente riempita d'aria. L'aria deve essere espulsa cautamente mentre si inserisce l'ago attraverso lo strato di ottanolo. Si aspira nella siringa un adeguato volume di fase acquosa. Si toglie rapidamente la siringa dalla soluzione e si rimuove l'ago. Il contenuto della siringa può quindi essere impiegato come campione della fase acquosa. La concentrazione nelle due fasi separate va determinata preferibilmente attraverso un metodo specifico per la sostanza. Esempi di determinazioni chimico-fisiche che possono essere adatte sono i seguenti:

— metodi fotometrici;

— gascromatografia;

— cromatografia su fase liquida ad alta pressione.

2. DATI

Se il valore di P_{oa} misurato è maggiore di 10^4, si raccomanda di confrontare i risultati con un valore di P_{oa} calcolato, ad esempio, col metodo di cui al riferimento bibliografico (3).

L'attendibilità dei valori di P così determinati può essere controllata confrontando le medie delle determinazioni in doppio con la media complessiva.

3. RELAZIONE

Nella relazione devono essere riportate se possibile, le seguenti informazioni:

— indicazione precisa della sostanza (identità ed impurezze);

— temperatura della determinazione;

— dati sui procedimenti analitici impiegati per determinare le concentrazioni;

— le concentrazioni misurate in ambedue le fasi per ciascuna determinazione (ciò significa che dovrà essere riportato un totale di 12 concentrazioni);

— il peso della sostanza in esame, il volume di ciascuna fase impiegata in ciascun recipiente di prova e la quantità calcolata della sostanza in esame presente in ciascuna fase dopo equilibrazione;

— i valori calcolati per il coefficiente di ripartizione (P), e le medie per ciascuna serie di condizioni sperimentali, nonché la media per tutte le determinazioni. Se si verifica il sospetto di una dipendenza dalla concentrazione del coefficiente di ripartizione, ciò va menzionato nella relazione;

— la deviazione standard dei singoli valori di P rispetto alla loro media;

— la media di tutte le determinazioni di P, espressa sotto forma del suo logaritmo decimale;

— il valore teorico calcolato per P_{oa} quando esso è stato determinato o quando il valore misurato è $> 10^4$;

— il pH dell'acqua impiegata e della fase acquosa durante la determinazione;

— ogni informazione o commento significativi per l'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107. Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107. ref (2) Decision of the Council C (81) 30 Final.

(3) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107. ref (10) Decision of the Council C (81) 30 Final.

A. 9. PUNTO D'INFIAMMABILITÀ

1. METODO

1.1. Introduzione

Prima di procedere all'esecuzione della prova sarà utile disporre di informazioni preliminari sulla infiammabilità della sostanza. Il metodo è applicabile alle sostanze liquide, nella forma in cui vengono commercializzate, i cui vapori possono infiammarsi mediante sorgenti di accensione. I metodi sperimentali descritti nel presente documento sono utilizzabili soltanto per gli intervalli di punto di infiammabilità specificati nei singoli metodi.

1.2. Definizioni e unità

Il punto di infiammabilità è la più bassa temperatura, corretta alla pressione di 101,325 kPa, alla quale il liquido in esame, contenuto in un recipiente chiuso, sviluppa vapori, nelle condizioni definite nel metodo sperimentale, in quantità tali da formare nel recipiente una miscela infiammabile vapore/aria.

Unità: °C

$t = T - 273{,}15$

dove t è espresso in °C e T in K.

1.3. Sostanze di riferimento

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono essere impiegate essenzialmente per la calibrazione periodica del metodo e per permettere il confronto dei risultati quando si ricorre ad un altro metodo.

1.4. Principio del metodo

La sostanza viene posta in un apposito recipiente di prova che viene riscaldato progressivamente sino a quando il vapore raggiunge una concentrazione sufficientemente elevata nell'aria da produrre una miscela infiammabile capace di infiammarsi.

1.5. Criteri di qualità

1.5.1. *Ripetibilità*

La ripetibilità varia secondo l'intervallo di punto di infiammabilità ed il metodo sperimentale applicato; massimo: ± 2 °C.

1.5.2. *Sensibilità*

La sensibilità dipende dal metodo sperimentale applicato.

1.5.3. *Specificità*

La specificità di alcuni metodi sperimentali è limitata a particolari intervalli di punto di infiammabilità e dipende dalle caratteristiche delle sostanze (come ad esempio la elevata viscosità).

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Preparazione*

Un campione della sostanza in esame viene posto in un apparecchio di prova in conformità a quanto indicato nei punti 1.6.3.1 e/o 1.6.3.2.

1.6.2. *Condizioni di prova*

L'apparecchio deve essere collocato preferibilmente lontano da correnti d'aria.

1.6.3. *Modo di operare*

1.6.3.1. Metodo basato sull'equilibrio

Vedi norme ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 e ISO 3679.

1.6.3.2. Metodo basato sul non equilibrio

Apparecchio di Abel:

Vedi norme BS 2000, parte 170, NF M07-011 e NF T66-009.

Apparecchio di Abel-Pensky:

Vedi norme (EN 57), NF M07-036, DIN 51755 — parte 1 — (per temperature comprese tra 5 °C e 65 °C) e DIN 51755 — parte 2 — (per temperature al di sotto di 5 °C).

Apparecchio di Tag:

Vedi norme ASTM D 56 e ISO 2719.

Apparecchio di Pensky-Martens:

Vedi norme ISO 2719, (EN 11), DIN 51758, ASTM 8013, ASTM D 93, BS 2000/34 e NF M 07-019.

Osservazioni

Quando il punto di infiammabilità, determinato mediante un metodo basato sul non equilibrio scelto tra quelli elencati al punto 1.6.3.2, risulta essere pari a 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C, 55 ± 2 °C, occorre confermarlo con un metodo basato sull'equilibrio, utilizzando la stessa apparecchiatura.

Ai fini della notifica possono applicarsi solo i metodi che forniscono la temperatura del punto di infiammabilità. Per determinare il punto di infiammabilità di liquidi viscosi (vernici, gomme e prodotti analoghi) contenenti solventi, possono impiegarsi soltanto apparecchiature e metodi di prova adatti alla determinazione del punto di infiammabilità di liquidi viscosi. Vedi norme ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 e DIN 53213, parte 1.

2. DATI

3. RELAZIONE

Nella relazione devono figurare, se possibile, le seguenti informazioni:

— la descrizione precisa della sostanza (identità e impurezze presenti),

— l'indicazione del metodo impiegato e di eventuali deviazioni da esso,

— i risultati di tutte la informazioni e le osservazioni utili ai fini dell'interpretazione dei risultati.

4. BIBLIOGRAFIA

Nessuna.

A. 10. INFIAMMABILITA (SOLIDI)

1. METODO

1.1. Introduzione

Prima di effettuare la prova sarà utile disporre di informazioni preliminari sulle eventuali proprietà esplosive della sostanza. La presente prova può essere applicata esclusivamente a sostanze in polvere, granulari e pastose. Evitando di considerare tutte le sostanze capaci di infiammarsi e limitandosi soltanto a quelle che bruciano rapidamente o il cui comportamento alla combustione presenta particolari pericoli di qualsiasi genere, si considerano come facilmente infiammabili soltanto le sostanze la cui velocità di combustione supera un certo valore limite. Sono inoltre considerate facilmente infiammabili le polveri metalliche capaci di incandescenza, qualora essa si propaghi attraverso il campione. Qualora si infiammino, le polveri metalliche sono infatti particolarmente pericolose a causa delle difficoltà di estinguere l'incendio; i normali agenti di estinzione, come l'anidride carbonica o l'acqua, possono infatti aumentare notevolmente il pericolo.

1.2. Definizione e unità

La velocità di combustione è espressa in secondi.

1.3. Composti di riferimento

Non specificati.

1.4. Principio del metodo

Al prodotto, nella forma in cui viene commercializzato, viene fatta assumere, mediante uno stampo, una forma opportuna della lunghezza di 250 mm. Si effettua poi un tentativo di accensione alle condizioni definite al punto 1.6.3, e si misura il tempo di combustione.

1.5. Criteri di qualità

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Preparazione*

Nel caso delle sostanze granulari o in polvere, il prodotto commerciale viene versato liberamente in un apposito stampo fino a riempimento. Tale stampo, in metallo, deve avere una lunghezza di 250 mm, ed una sezione triangolare con un'altezza interna di 10 mm ed una larghezza interna di 20 mm. Su ambedue i lati dello stampo, in senso longitudinale, sono montate due lastrine di metallo, con la funzione di limiti laterali; esse devono sporgere di 2 mm oltre il bordo superiore della sezione triangolare (vedi figura), lo stampo viene poi lasciato cadere per tre volte su una superficie solida, dall'altezza di 2 cm. Se necessario, lo stampo viene nuovamente riempito. Si asportano poi le lastrine laterali e si elimina la sostanza in eccesso. Si pone sopra lo stampo una piastra non combustibile e non porosa, si capovolge il tutto e si toglie lo stampo.

Le sostanze pastose devono essere distribuite su una superficie incombustibile in forma tubolare su una lunghezza di 250 mm ed una sezione di 1 cm^2 circa.

Per innescare l'accensione ad una delle estremità del campione così preparato si può impiegare una qualsiasi fonte di accensione adeguata, come una piccola fiamma o un filo metallico riscaldato almeno alla temperatura di 1 000 °C.

1.6.2. *Condizioni sperimentali*

Nel caso di una sostanza sensibile all'umidità, la prova deve essere effettuata con la massima rapidità possibile subito dopo aver tolto la sostanza stessa dal recipiente.

1.6.3. *Modo di operare*

Provocare l'accensione di un'estremità del campione. Dopo che la sostanza ha bruciato per una distanza di 80 mm, misurare la velocità di combustione sui successivi 100 mm. La prova va ripetuta sei volte, impiegando ogni volta una piastra fredda e pulita.

2. DATI

Sono necessari ai fini della valutazione i valori dei tempi di combustione determinati nel corso delle sei prove.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione della prova

La relazione deve comprendere, se possibile, i seguenti dati:

— l'indicazione esatta della sostanza (natura chimica e impurezze presenti);

— la descrizione dello stato fisico della sostanza esaminata, compreso il contenuto di umidità;

— i risultati delle misure;

— ogni ulteriore informazione e osservazione utile ai fini dell'interpretazione dei risultati.

3.2. Interpretazione dei risultati

Le sostanze in polvere, granulari o pastose sono considerate facilmente infiammabili se il tempo di combustione di una delle sei prove effettuate secondo il procedimento descritto al punto 1.6 è inferiore a 45 secondi. Le polveri metalliche o di leghe metalliche sono considerate facilmente infiammabili se suscettibili di accensione, e se la fiamma o la zona di reazione si propagano all'intero campione.

4. BIBLIOGRAFIA

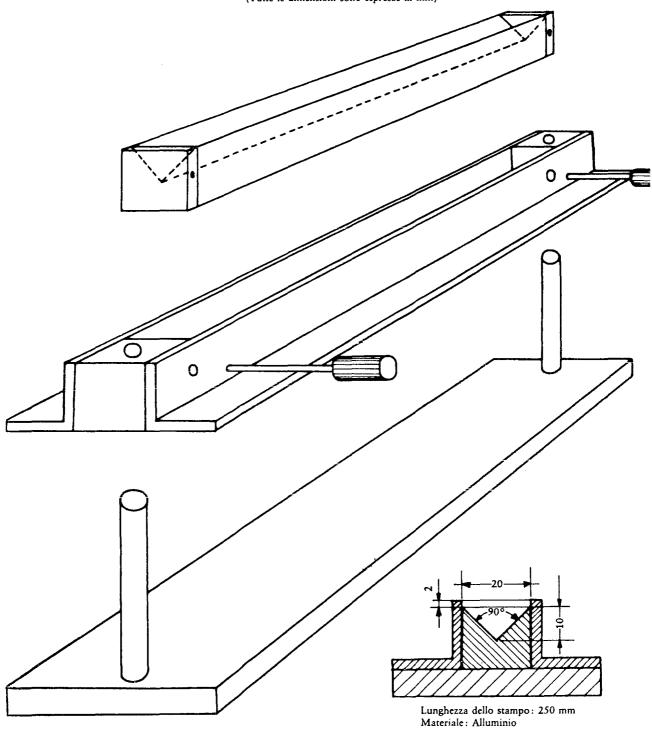
Nessuna.

Appendice

Figura

Stampo e accessori per la preparazione del campione

(Tutte le dimensioni sono espresse in mm)

Lunghezza dello stampo: 250 mm
Materiale: Alluminio

A. 11. INFIAMMABILITA (GAS)

1. METODO

1.1. Introduzione

Questo metodo consente di determinare se un gas miscelato con l'aria, a temperatura ambiente e a pressione atmosferica, presenta un intervallo d'infiammabilità. Miscele a concentrazioni crescenti del gas in esame con l'aria vengono esposte a una scintilla elettrica e si osserva se ha luogo l'accensione.

1.2. Definizione e unità

L'intervallo d'infiammabilità è l'intervallo di concentrazione compreso fra il limite minimo e il limite massimo di esplosione. I limiti minimo e massino di esplosione sono quei limiti di concentrazione del gas infiammabile in miscela con l'aria ai quali non si verifica la propagazione della fiamma.

1.3. Sostanza di riferimento

Non specificata.

1.4. Principio del metodo

La concentrazione del gas nell'aria viene aumentata gradualmente e ad ogni livello di concentrazione la miscela viene esposta ad una scintilla elettrica.

1.5. Criteri di qualità

Non stabiliti.

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Apparecchiatura*

Il recipiente di prova è costituito da un cilindro verticale di vetro con un diametro interno di almeno 50 mm ed una altezza di 300 mm. Gli elettrodi di accensione, separati da una distanza di 3—5 mm, sono collocati 60 mm al di sopra del fondo del cilindro. Il cilindro è provvisto di un'apertura per lo sfogo della pressione. L'apparecchio deve essere schermato in modo da limitare gli eventuali danni dovuti ad esplosione.

Come fonte di accensione si impiega una scintilla ad induzione permanente della durata di 0,5 sec, generata da un trasformatore ad alto voltaggio con una tensione di uscita compresa fra 10 e 15 kV (potenza massima di entrata: 300 W).

1.6.2. *Condizioni sperimentali*

La prova deve essere eseguita a temperatura ambiente.

1.6.3. *Modo di operare*

Impiegando pompe proporzionali, si introduce nel cilindro di vetro una miscela gas-aria a concentrazione nota. Far scoccare una scintilla attraverso la miscela e osservare se dalla fonte di accensione si distacca una fiamma che si propaga autonomamente. La concentrazione del gas va aumentata con incrementi successivi dell'1 % in volume, fino al momento in cui si verifica l'accensione sopra descritta.

2. DATI

La propagazione della fiamma è l'unico fenomeno significativo per la determinazione di questa proprietà.

3. RELAZIONE

Nella relazione devono essere riportate, se possibile, le seguenti informazioni:

— la descrizione esatta della sostanza (identità e impurezze presenti),
— la descrizione dell'apparecchiatura utilizzata con l'indicazione delle dimensioni,
— la temperatura ambiente alla quale la prova è stata eseguita,
— le diverse concentrazioni impiegate e i risultati ottenuti,
— il risultato della prova: gas non infiammabile o gas facilmente infiammabile,
— nel caso in cui il gas sia risultato « non infiammabile », si deve dichiarare che sono state provate tutte le concentrazioni, con incrementi successivi dell'1 %, da 0 fino al 100 %,
— tutte le informazioni e le osservazioni utili ai fini dell'interpretazione dei risultati.

4. BIBLIOGRAFIA

Nessuna.

A. 12. INFIAMMABILITÀ (SOSTANZE E PREPARATI CHE, A CONTATTO CON ACQUA O ARIA UMIDA, SVILUPPANO GAS FACILMENTE INFIAMMABILI IN QUANTITÀ PERICOLOSE)

1. METODO

1.1. Introduzione

Questo metodo può essere utilizzato per determinare se la reazione di una sostanza con l'acqua dà luogo alla formazione di quantità pericolose di uno o più di gas potenzialmente tossici o facilmente infiammabili. Il metodo è applicabile sia alle sostanze solide che a quelle liquide. Esso non è applicabile alle sostanze che si infiammano spantaneamente a contatto con l'aria.

1.2. Definizioni e unità

« Facilmente infiammabili » si dicono le sostanze e i preparati che a contatto con l'acqua o con l'aria umida sviluppano gas facilmente infiammabili in quantità pericolose, alla velocità minima di 1 l/kg·h. Questo limite non tiene conto della tossicità dei gas.

1.3. Principio del metodo

La sostanza viene sottoposta a prova secondo il procedimento a più livelli descritto più avanti; se l'accensione si verifica ad uno qualsiasi dei livelli non sono necessari ulteriori prove.

1.3.1. *Livello 1*

La sostanza in esame viene versata in un recipiente contenente acqua distillata a 20 °C e si osserva se il gas sviluppato si infiamma o meno.

1.3.2. *Livello 2*

La sostanza in esame viene posta su un foglio di carta da filtro galleggiante sulla superficie in un recipiente contenente acqua distillata a 20 °C e si osserva se il gas sviluppato si infiamma o meno. La carta da filtro ha semplicemente la funzione di evitare la dispersione della sostanza in acqua, aumentando così le possibilità di accensione.

1.3.3. *Livello 3*

La sostanza in esame viene disposta in forma approssimativamente cilindrica di circa 2 cm di altezza e 3 cm di diametro. Si aggiungono alcune gocce di acqua e si osserva se il gas sviluppato si infiamma.

1.3.4. *Livello 4*

La sostanza in esame viene mescolata con acqua distillata a 20 °C e si misura la velocità di sviluppo del gas per un periodo di 7 ore ad intervalli di un'ora. Se la velocità di formazione del gas non è costante, o è ancora in aumento dopo 7 ore, si deve prolungare il tempo di misurazione fino ad un massimo di 5 giorni. La prova può essere sospesa in qualsiasi momento se la velocità di sviluppo del gas supera 1 l/kg·h.

1.4. **Sostanza di riferimento**

Non specificata.

1.5. **Criteri di qualità**

Non stabiliti.

1.6. **Descrizione dei metodi**

1.6.1. *Livello 1*

1.6.1.1. Condizioni di prova

La sostanza da esaminare deve essere utilizzata nella forma in cui viene posta in commercio; la prova va eseguita a temperatura ambiente (circa 20 °C).

1.6.1.2 Esecuzione della prova

Una piccola quantità (2 mm circa di diametro) della sostanza da esaminare viene posta in un recipiente contenente acqua distillata. Si deve osservare: (i) se si ha sviluppo di gas; (ii) se si verifica l'accensione del gas. Se si verifica l'accensione del gas, non sono necessarie ulteriori prove, poiché la sostanza deve essere considerata pericolosa.

1.6.2. *Livello 2*

1.6.2.1. Apparecchiatura

Un foglio di carta da filtro viene fatto galleggiare sulla superficie di acqua distillata contenuta in un qualsiasi recipiente idoneo, per esempio una capsula da evaporazione del diametro di 100 mm.

1.6.2.2. Condizioni di prova

La sostanza da esaminare deve essere utilizzata nella forma in cui viene posta in commercio; la prova va eseguita a temperatura ambiente (circa 20 °C).

1.6.2.3. Esecuzione della prova

Una piccola quantità della sostanza in esame (2 mm circa di diametro) viene posta al centro del foglio di carta da filtro. Si deve osservare: (i) se si ha sviluppo di gas; (ii) se si verifica l'accensione del gas. Se si verifica l'accensione del gas, non sono necessarie ulteriori prove, poiché la sostanza deve essere considerata pericolosa.

1.6.3. *Livello 3*

1.6.3.1. Condizioni di prova

La sostanza da esaminare deve essere utilizzata nella forma in cui viene posta in commercio; la prova dev'essere eseguita a temperatura ambiente.

1.6.3.2. Esecuzione della prova

La sostanza da esaminare viene disposta in forma approssimativamente cilindrica di circa 2 cm d'altezza e 3 cm di diametro, con una leggera concavità sulla cima. Si aggiungono alcune gocce di acqua e si osserva: (i) se si ha sviluppo di gas; (ii) se si verifica l'accensione del gas. Se si verifica l'accensione del gas, non sono necessarie ulteriori prove, poiché la sostanza deve essere considerata pericolosa.

1.6.4. *Livello 4*

1.6.4.1. Apparecchiatura

L'apparecchiatura è descritta nella figura in appendice.

1.6.4.2. Condizioni di prova

Controllare il contenitore della sostanza da esaminare per accertare l'eventuale presenza di polveri al di sotto di 500 µm (dimensioni delle particelle). Se il contenuto in polvere supera l'1 % (p/p) del totale, o se il campione è friabile, tutta la sostanza deve essere ridotta in polvere prima della prova, per tener conto della riduzione di formato delle particelle durante l'immagazzinamento e la manipolazione; in caso contrario, la sostanza deve essere utilizzata nella forma in cui viene posta in commercio. La prova deve essere eseguita a temperatura ambiente (20 °C) e a pressione atmosferica.

1.6.4.3. Esecuzione della prova

L'imbuto superiore dell'apparecchio viene riempito d'acqua e nella beuta viene posta una quantità pesata di sostanza (fino ad un massimo di 25 g), sufficiente a produrre da 100 a 250 cm^3 di gas. Il volume del gas prodotto può essere misurato con un qualsiasi mezzo adeguato. Si apre il rubinetto dell'imbuto, in modo da lasciar cadere l'acqua nella beuta, e si fa scattare un cronometro. Si misura il tempo necessario per lo sviluppo completo del gas. Se possibile, saranno effettuate rilevazioni intermedie. Questa prova deve essere eseguita tre volte. Il gas deve essere analizzato, se non se ne conosce l'identità chimica. Quando esso contiene componenti facilmente infiammabili e si ignora se la miscela globale è anch'essa facilmente infiammabile, si deve preparare una miscela della stessa composizione, da sottoporre a prova secondo il metodo previsto (A. 11).

2. DATI

L'accensione o lo sviluppo di gas altamente infiammabili, verificatosi almeno una volta su tre, sono sufficienti a far considerare la sostanza in esame come pericolosa (1.6.1, 1.6.2 e 1.6.3).

3. RELAZIONE

La relazione deve contenere se possibile le seguenti informazioni:

— l'esatta specificazione e descrizione (per esempio, colore, dimensioni delle particelle e stato fisico) della sostanza nello stato in cui viene ricevuta,

— ogni eventuale trattamento preliminare del campione in esame,

— i risultati delle prove,

— l'identità chimica del gas che si sviluppa,

— la velocità di formazione del gas (1.6.4),

— ogni ulteriore osservazione utile ai fini dell'interpretazione dei risultati.

4. BIBLIOGRAFIA

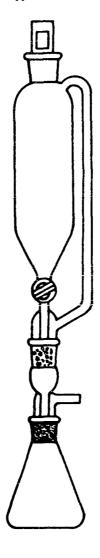
(1) ISO 1773.

(2) OECD, Paris, Preliminary Test Guideline for the Determination of Substances which give off Highly Inflammable Gases in Dangerous Amounts on Contact with Water A 80/28 — Final report of the OECD chemical testing programme.

(3) U.N. doc. No ST/SG/AC10/1 rev 1.

Appendice

Figura

Apparecchiatura

A. 13. INFIAMMABILITA (SOLIDI — LIQUIDI)

1. METODO

1.1. Introduzione

Sarà utile disporre di informazioni preliminari sull'autoinfiammabilità della sostanza in esame. Il procedimento indicato è applicabile alle sostanze solide e liquide, nella forma in cui vengono commercializzate che si accendono spontaneamente in piccoli quantitativi poco dopo un'esposizione all'aria a temperatura ambiente. Il presente metodo di prova non è applicabile alle sostanze che, per il verificarsi dell'autoaccensione, richiedono un'esposizione all'aria di ore o giorni a temperatura ambiente, oppure un esposizione a temperature molto più elevate.

1:2. Definizione e unità

I liquidi e i solidi sono considerati facilmente infiammabili se l'accensione si verifica almeno una volta sulle 6 prove eseguite alle condizioni descritte al punto 1.6. Per i liquidi può anche essere necessario controllare l'autoinfiammabilità secondo il metodo A.15 (Autoinfiammabilità: determinazione della temperatura di autoaccensione di liquidi volatili e di gas).

1.3. Sostanze di riferimento

Non specificata.

1.4. Principio del metodo

La sostanza viene portata a contatto con l'aria ad una temperatura di 25 ± 10 °C per 5 minuti. Se si verifica l'accensione, la sostanza è considerata facilmente infiammabile.

1.5. Criteri di qualità

Ripetibilità: per ragioni di sicurezza, un risultato positivo su 6 prove è sufficiente per giudicare la sostanza facilmente infiammabile.

1.6. Descrizione del metodo di prova

1.6.1. *Apparecchiatura*

Un recipiente di porcellana di circa 10 cm di diametro viene riempito con terra di diatomee per un'altezza di circa 5 mm a temperatura ambiente.

Nota

La terra di diatomee o qualsiasi altra analoga sostanza inerte facilmente reperibile, è da considerarsi rappresentativa di un suolo su cui può riversarsi la sostanza di prova in caso di incidente.

1.6.2. *Esecuzione della prova*

a) Solidi in polvere
Da 1 a 2 cm^3 della polvere da esaminare vengono versati da circa 1 m di altezza su una superficie incombustibile, e si osserva se la sostanza si infiamma durante la caduta o entro 5 minuti.

b) Liquidi
Circa 5 cm^3 del liquido da esaminare vengono versati nel recipiente di porcellana preparato come precedentemente indicato e si osserva se la sostanza si infiamma entro 5 minuti.

2. DATI

Ai fini della valutazione sono necessari i risultati delle 6 prove.

3. RELAZIONE

La relazione deve comprendere, se possibile, i seguenti dati:

— una descrizione della sostanza in esame;

— i risultati della prova.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, Preliminary Test Guideline for the Determination of Pyrophoric Behaviour of Solids and Liquids. A80/23 — Final report of the OECD chemical testing programme.

A. 14. PROPRIETA ESPLOSIVE

1. METODO

1.1. Introduzione

Il metodo fornisce uno schema di prove per determinare se una sostanza od un preparato solido, liquido o di consistenza pastosa presenta o meno un pericolo d'esplosione qualora venga sottoposto all'azione di una fiamma (sensibilità termica), oppure ad urti o sfregamenti (sensibilità a sollecitazioni meccaniche).

Il metodo è composto da tre parti:

a) una prova di sensibilità termica;

b) una prova di sensibilità meccanica agli urti;

c) una prova di sensibilità meccanica all'attrito.

Dal metodo si ricavano dati per valutare la probabilità che talune semplici sollecitazioni possano provocare un'esplosione. Il metodo non può essere impiegato per stabilire se una sostanza o un preparato siano capaci o meno di esplodere in qualsiasi condizione o per determinare in che misura una decomposizione iniziale possa assumere andamento esplosivo, provocando la deflagrazione dell'intero campione.

Il metodo è idoneo a determinare se una sostanza od un preparato presentano o meno un rischio di esplosione (sensibilità termica e meccanica) nelle particolari condizioni specificate dalla direttiva. Le prove in questione non hanno alcun rilievo quando i dati termodinamici disponibili (calore di formazione, calore di decomposizione, assenza di taluni gruppi reattivi (1) nella formula di struttura) mostrano, al di là di ogni ragionevole dubbio, che la sostanza o il preparato in esame è incapace di decomporsi, sviluppare gas e produrre calore con grande rapidità (che cioè il materiale non presenta alcun rischio di esplosione). Il metodo non è da considerarsi definitivo. Nell'ambito delle prove si sono scelti numerosi tipi di apparecchiature specifiche, ampiamente utilizzate a livello internazionale, che normalmente forniscono risultati significativi.

Lo sperimentatore può decidere di impiegare apparecchiature differenti per i tre metodi di prova previsti, purché tale scelta sia giustificata sotto il profilo scientifico e le apparecchiature siano internazionalmente riconosciute. In tal caso, egli deve determinare la correlazione esistente tra i risultati da lui ottenuti e quelli determinati con le apparecchiature prescritte.

1.2. Definizioni ed unità di misura

Sono esplosive le sostanze e i preparati capaci di esplodere per l'azione di una fiamma, oppure la cui sensibilità all'urto o all'attrito sia maggiore di quella del dinitrobenzene.

1.3. Sostanza di riferimento

m-Dinitrobenzene (prodotto tecnico cristallino) per le prove di attrito e di urto.

1.4. Principio del metodo

Al fine di stabilire quali siano le condizioni di sicurezza per eseguire le tre prove di sensibilità è necessaria una prova orientativa preliminare.

1.4.1. *Prova orientativa preliminare*

Quantità molto ridotte del campione della sostanza o del preparato (circa 10 mg) sono sottoposte, senza costrizioni fisiche, a riscaldamento mediante bruciatore Bunsen, ad urti in un qualunque tipo di apparecchiatura adatta allo scopo e, infine, a sfregamento con l'impiego di un mazzuolo e di un'incudine o di qualunque altra apparecchiatura capace di produrre attriti. Tali prove servono a stabilire se la sostanza sia talmente sensibile ed esplosiva da rendere consigliabili speciali precauzioni durante lo svolgimento delle prove descritte, al fine di evitare danni all'operatore.

1.4.2. *Sensibilità termica*

Il metodo prevede il riscaldamento della sostanza o del preparato in un tubo d'acciaio che permetta di ottenere gradi variabili di costrizione mediante l'impiego di piastre forate con fori di diverso diametro, al fine di determinare se la sostanza od il preparato in esame tenda ad esplodere per effetto di sollecitazioni termiche.

1.4.3. *Sensibilità meccanica* (agli urti)

Il metodo prevede che la sostanza od il preparato in esame sia sottoposto all'urto di un martello che cada su un'incudine di acciaio.

1.4.4. *Sensibilità meccanica* (all'attrito)

Il metodo prevede che la sostanza od il preparato venga sottoposto all'attrito generato da superfici normalizzate, in determinate condizioni di carico e moto relativo.

1.5. **Criteri qualitativi**

Non stabiliti.

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. *Apparecchiature*

1.6.1.1. Sensibilità termica (effetto della fiamma)

Il tubo d'acciaio da impiegare per le prove è ottenuto mediante imbutitura da una lastra di acciaio adatto a tale scopo (vedi appendice). Esso deve avere un diametro interno di 24 mm, una lunghezza di 75 mm e pareti dello spessore di 0,5 mm. All'estremità aperta il tubo è fornito di una flangia di chiusura (vedi figura 1). Esso dispone inoltre di una placca rotonda munita di foro centrale e resistente alla pressione, saldamente fissata al contenitore stesso mediante un giunto a vite formato di due parti (dado e dado cieco). Tale placca (vedi figura 1), dello spessore di 6 mm, è ricavata da un blocco di acciaio al cromo resistente al calore (vedi appendice). Lo sperimentatore dispone di una serie di tali placche, aventi aperture di diverso diametro (1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 . . . mm), così da poter stabilire quale grado di rischio d'esplosione presenta la sostanza od il preparato in esame. Il dado ed il dado cieco (vedi figura 1) sono di acciaio al cromo-manganese (vedi appendice), non suscettibile di provocare scintille fino ad 800 °C. Ogni tubo dev'essere impiegato soltanto per una prova.

1.6.1.2. Sensibilità meccanica (agli urti)

Una tipica apparecchiatura a massa cadente consiste essenzialmente in un blocco di acciaio fuso (o ghisa grigia); munito di base, incudine, colonna, guide, peso cadente e meccanismo di rilascio. Il blocco di acciaio (lungo 230 mm, largo 250 mm ed alto 200 mm) è dotato di un piede in ghisa (lungo 450 mm, largo 450 mm ed alto 60 mm) e sorregge l'incudine d'acciaio (100 mm di diametro e 70 mm d'altezza), che è avvitata al blocco stesso. Sul retro del blocco d'acciaio è avvitato un sostegno cui è fissata la colonna, costituita da un tubo in un unico pezzo di acciaio imbutito. Quattro viti, fissate in un blocco cubico di cemento di 60 cm di lato, mantengono il martello in una posizione tale che le guide sono

perfettamente verticali ed il martello stesso può scorrervi senza difficoltà. Il peso del martello, costituito interamente d'acciaio, deve essere di 10 kg, deve avere una superficie d'impatto di acciaio temperato (durezza compresa fra 60 e 63 HRC) ed un diametro minimo di 25 mm. Le prove vanno eseguite con un altezza di caduta di 0,4 m.

Il campione da esaminare viene posto in un dispositivo costituito da due cilindri pieni in acciaio, coassiali e sovrapposti, e da un cilindro cavo in acciaio, che funge da guida. I cilindri pieni devono misurare 10 (− 0,003, − 0,005) mm di diametro e 10 mm di altezza, ed avere inoltre superfici levigate, spigoli arrotondati (raggio di curvatura 0,5 mm) e durezza compresa tra 58 e 65 HRC. Il cilindro cavo deve avere un diametro esterno di 16 mm, un foro a pareti levigate del diametro di 10 (+ 0,005, + 0,010) mm ed un'altezza di 13 mm. Qualora l'esplosione si verifichi, i cilindri d'acciaio e quello cavo non dovranno essere impiegati per ulteriori prove. Il dispositivo descritto è posto verticalmente su un incudine intermedia d'acciaio, il cui diametro e la cui altezza sono entrambi di 26 mm, ed è centrato mediante un apposito anello; un opportuno sistema serve a dar sfogo ai fumi di eventuali esplosioni.

1.6.1.3. Sensibilità meccanica (alla frizione)

L'apparecchiatura per le prove di frizione consiste in una piastra di base in acciaio fuso (o ghisa grigia), sulla quale è montato il dispositivo di attrito, costituito da una sbarra fissa di porcellana e da piastre mobili, pure di porcellana. La piastra di porcellana viene fissata ad una slitta, scorrevole tra due guide. Tale slitta è mossa mediante un alberino motore, una puleggia eccentrica ed un ingranaggio di trasmissione collegato ad un motore elettrico. Tale meccanismo fa sì che la piastra di porcellana possa muoversi sotto la sbarra di porcellana, con un movimento alternato dell'ampiezza di 10 mm. La sbarra di porcellana dev'essere sottoposta ad un carico di circa 360 Newton.

Le piastre sono di porcellana tecnica bianca e misurano 25 mm di lunghezza × 25 mm di larghezza × 5 mm di altezza. Entrambe le superfici di attrito delle piastre sono rese ruvide, con profondità di abrasione compresa fra 9 µm e 32 µm, strofinandole con una spugna prima della cottura. La sbarra cilindrica è costituita anch'essa di porcellana tecnica bianca. Essa ha una lunghezza di 15 mm ed un diametro di 10 mm ; alle estremità presenta superfici ruvide ed arrotondate, con un raggio di curvatura di 10 mm.

1.6.2. *Condizioni di prova*

1.6.2.1. Sensibilità termica (effetto della fiamma)

Il contenitore è riempito fino ad un'altezza di 60 mm con la sostanza da esaminare nella forma in cui deve essere commercializzata. Il riempimento va effettuato in tre tempi, con quantitativi uguali della sostanza stessa. Ogni volta, la sostanza dev'essere delicatamente compressa applicando alla sua superficie una forza di 80 Newton per mezzo di un apposito pistone di legno, di diametro leggermente inferiore a quello del recipiente. Per le sostanze gelatinose si dovrà aver cura di evitare la formazione di bolle d'aria nel corso del riempimento.

1.6.2.2. Sensibilità meccanica (urto)

La sostanza da esaminare deve trovarsi allo stato secco. Il campione deve avere un volume di 40 mm^3, oppure un volume adeguato all'apparecchiatura specificata. Per le sostanze solide, eccezion fatta per quelle pastose, vale quanto segue:

a) le sostanze in polvere devono essere setacciate (setaccio con maglie di 0,5 mm); per le prove si utilizza tutto quanto è passato attraverso il setaccio;

b) le sostanze pressate, fuse o altrimenti condensate devono essere disgregate e setacciate; per le prove si impiega la frazione granulometrica, ottenuta mediante setaccio, costituita da particelle di diametro compreso tra 0,5 ed 1 mm.

Nel caso delle sostanze liquide, il cilindro d'acciaio superiore deve essere spinto verso il basso, fino a che si trovi alla distanza di 1 mm dal cilindro inferiore, ed essere mantenuto in tale posizione.

1.6.2.3. Sensibilità meccanica (attrito)

La sostanza da esaminare deve trovarsi allo stato secco. Il volume del campione deve essere di 10 mm^3. Per le sostanze solide, eccezion fatta per quelle pastose, vale quanto segue:

a) le sostanze in polvere devono essere setacciate (setaccio con maglie di 0,5 mm); per le prove si utilizza tutto quanto è passato attraverso il setaccio;

b) le sostanze pressate, fuse o altrimenti condensate devono essere disgregate e setacciate; per le prove si utilizza la frazione granulometrica, ottenuta mediante setaccio costituita da particelle di diametro inferiore a 0,5 mm.

1.6.3. *Modalità d'esecuzione delle prove*

1.6.3.1. Sensibilità termica (effetto della fiamma)

Il riscaldamento è ottenuto mediante l'uso di propano, erogato da una bombola munita di regolatore di pressione (500 mbar) con manometro e distribuito, per mezzo di un raccordo, ai quattro bruciatori. I quattro bruciatori consumano 3,2 litri di propano al minuto. Se per il riscaldamento vengono impiegati altri gas, si devono scegliere adatti bruciatori e condizioni di consumo di gas e di aria tali che, a seguito di una misura comparativa con sostanze inerti (sabbia, dibutil ftalato), si registrano curve temperatura/tempo simili a quelle ottenute riscaldando con propano i tubi di prova.

I bruciatori devono essere collocati intorno alla camera di prova come indicato nella figura 2.

Essi vanno sistemati in modo che la punta del cono interno di colore blu della fiamma lambisca il recipiente. Le prove devono essere eseguite in una camera d'acciaio avente le dimensioni riportate nella figura 2.

Le dimensioni del bruciatore di propano sono indicate nelle figure 3a e 3b.

E obbligatorio eseguire due serie di tre prove, impiegando una piastra con un foro del diametro di 2 mm per la prima serie, e di un diametro superiore (ad esempio 6 mm) per la seconda.

Se nel corso della prima serie (foro da 2 mm) si verifica un'esplosione non è necessario procedere ad ulteriori prove. Qualora l'esplosione non si sia verificata entro 5 minuti, la prova si considera terminata.

1.6.3.2. Sensibilità meccanica (urti)

Qualora si impieghi l'apparecchiatura, descritta in precedenza, si effettuano sei prove lasciando cadere la massa di 10 kg dall'altezza di 0,4 m. Qualora invece si ricorra ad altre apparecchiature, il campione andrà confrontato con il m-dinitrobenzene utilizzando la procedura descritta (tecnica «su e giù», ecc.).

1.6.3.3. Sensibilità meccanica (attrito)

La sbarra di porcellana è posta sul campione in esame, ed il peso viene applicato ad essa; durante l'esecuzione della prova, le tracce della spugna sulla piastra di porcellana devono essere trasversali rispetto alla direzione del movimento. Occorre assicurarsi che la sbarra poggi sul campione, che sotto di essa vi sia una quantità sufficiente del materiale in esame ed infine che la piastra si muova correttamente sotto la sbarra. La piastra di porcellana deve venir mossa al di sotto della sbarra di porcellana, avanti e indietro, per una distanza di 10 mm in entrambe le direzioni e per un tempo di 0,44 secondi. Entrambe le superfici di porcellana possono venir impiegate solamente per una prova.

2. DATI

2.1. Trattamento dei risultati

Le prove possono venir interrotte non appena una di esse dia esito positivo.

2.2. Valutazione

In linea di massima si ritiene che una sostanza o un preparato presentano pericolo d'esplosione ai sensi della direttiva se:

a) si verifica un'esplosione (il recipiente esplode, cioè in tre o più frammenti) nell'ambito del prescritto numero di prove di sensibilità termica,

oppure

b) si verifica un'esplosione (l'accensione violenta del campione equivale ad un'esplosione) in almeno una delle sei prove eseguite con l'apparecchiaura prescritta per la sensibilità all'urto, oppure se il campione risulta più sensibile del m-dinitrobenzene in una prova alternativa per la sensibilità all'urto,

oppure

c) si verifica un'esplosione (il crepitio o l'accensione violenta equivalgono ad un'esplosione) in almeno una delle sei prove eseguite con l'apparecchiatura prescritta per la sensibilità all'attrito, oppure se il campione risulta più sensibile del m-dinitrobenzene in una prova alternativa per la sensibilità all'attrito.

3. RELAZIONI

3.1. Relazione sulla prova

La relazione deve contenere, se possibile, i seguenti dati:

— identità, composizione, purezza, contenuto di umidità, ecc., della sostanza o del preparato esaminati;

— stato fisico del campione, eventuale setacciatura, ecc.;

— osservazioni effettuate nel corso delle prove (tipo di reazione, scintille, fiamma, esplosione, numero di frammenti, ecc.);

— risultati di ogni singola prova;

— nel caso si sia utilizzato un altro tipo di apparecchiatura, tale fatto andrà giustificato sotto il profilo scientifico e si dovranno fornire prove dell'esistenza di una correlazione tra i risultati ottenuti con l'apparecchiatura prescritta e quelli ottenuti con una apparecchiatura equivalente;

— qualunque osservazione utile, come ad esempio riferimenti a prove condotte su prodotti analoghi, che possano risultare significative ai fini di una corretta interpretazione dei risultati.

3.2. Interpretazione e valutazione dei risultati

La relazione deve riportare tutti i risultati considerati erronei, anomali o non rappresentativi. Qualora non si tenga conto di uno qualunque dei risultati, si dovrà fornire una spiegazione di tale fatto e indicare i risultati di eventuali prove alternative o supplementari.

Talvolta i risultati possono avere un valore falsato, in quanto si riferiscono alla forma fisica o alla natura volatile nella quale la sostanza o il preparato si presentano durante la prova; in tal caso è utile sapere quali risultati si sarebbero ottenuti impiegando la sostanza od il preparato in esame nella forma in cui vengono immessi sul mercato. Tali informazioni potranno essere eventualmente ottenute con prove alternative. Se un risultato anomalo non può venire spiegato in tal modo, dev'essere accettato col suo valore effettivo, e la sostanza od il preparato in esame devono essere classificati di conseguenza.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards. London. Butterworths, 1979, p. 60—63.

(2) Koenen, H., Ide, K.H., Uber die Prüfung explosiver. Stoffe, I. Ermittlung der Reibempfindlichkeit, Explosivstoffe, Vol. 3, 1955, p. 57—65 und p. 89—93.

(3) Koenen, H., Ide, K. H., Über die Prüfung explosiver Stoffe, III. Ermittlung der Empfindlichkeit explosiver Stoffe gegen thermische Beanspruchung in einer Erhitzungskammer mit verschiedenen definierten Offnungen (Stahlhusenverfahren), Explosivstoffe, Vol. 4, 1956, p. 119—125, 143—148.

(4) Koenen, H., Ide, K. H., Haupt, W., Über die Prüfung explosiver Stoffe, IV. Ermittlung der Schlagempfindlichkeit explosiver Stoffe von fester, flüssiger und gelatinoser Beschaffenheit, Explosivstoffe, Vol. 6, 1958, p. 178—189, 202—214 und 223—235.

(5) ONU, 1980, December, United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (document ST/SG/AC/.10/5/Add.3, Table 4.3).

Appendice

Esempi di specifiche relative ai materiali

(1) Specifica relativa ai materiali n. 1.0336.505 g, conforme a DIN 1623 foglio 1.

(2) Specifica relativa ai materiali n 1.4873, conforme al foglio «Stahl-Eisen-Werkstoff» 490—52.

(3) Specifica relativa ai materiali n. 1.3817, conforme al foglio «Stahl-Eisen-Werkstoff» 490—52.

Figura 1

(Le quote sono espresse in mm)

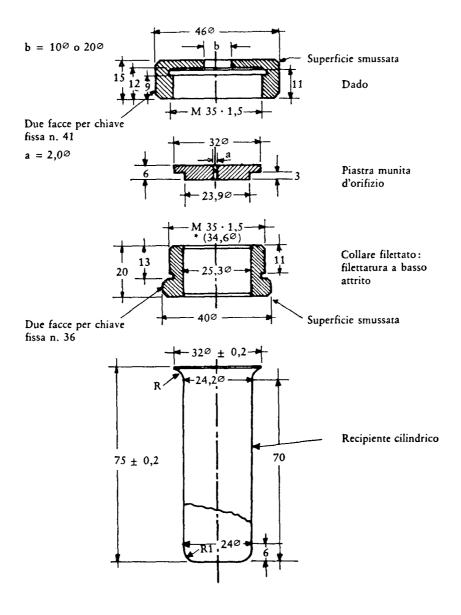
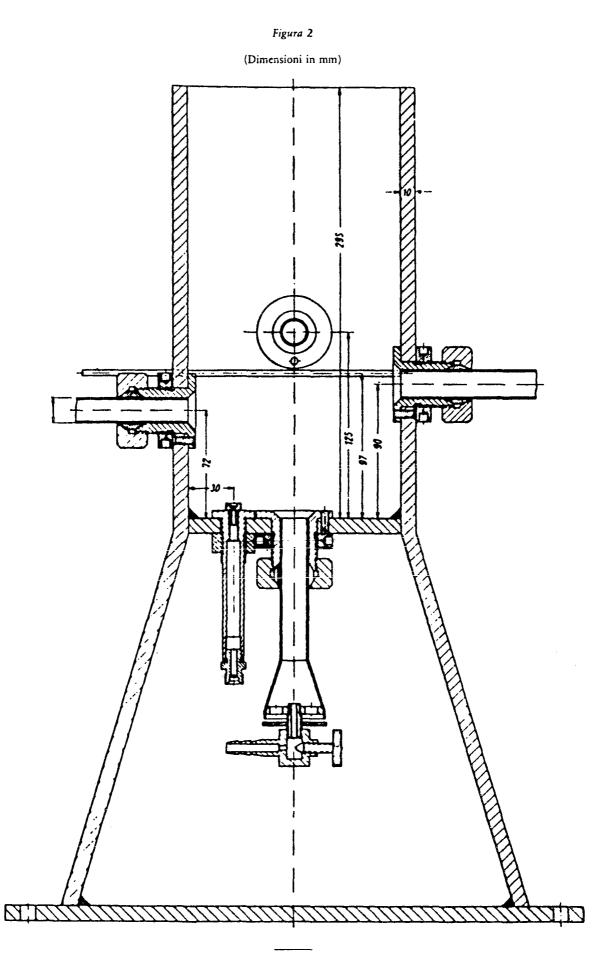
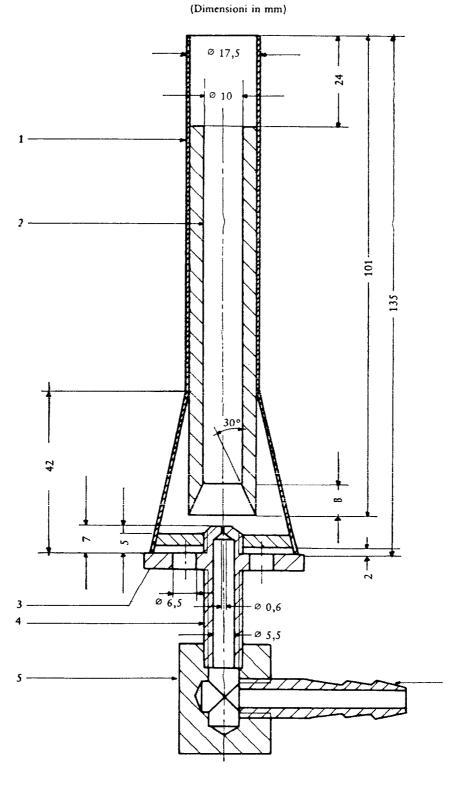
Figura 2

(Dimensioni in mm)

Figura 3a

Materiali: ottone

(Dimensioni in mm)

Figura 3b

Materiali: ottone

(Dimensioni in mm)

A. 15. AUTOINFIAMMABILITÀ — DETERMINAZIONE DELLA TEMPERATURA DI AUTOACCENSIONE DI LIQUIDI VOLATILI E DI GAS

1. METODO

1.1. Introduzione

Prima di effettuare la prova sarà utile disporre di informazioni preliminari sull'autoinfiammabilità della sostanza. Il metodo è applicabile alle sostanze gassose e ai liquidi volatili nella forma in cui vengono commercializzati, i quali, o i vapori dei quali, in presenza di aria possono infiammarsi al contatto con una superficie calda. La temperatura di autoaccensione può essere considerevolmente ridotta dalla presenza di impurezze catalitiche.

1.2. Definizioni e unità

Il grado di autoinfiammabilità viene espresso in termini di temperatura di autoaccensione. La temperatura di autoaccensione è la più bassa temperatura alla quale la sostanza in esame, miscelata con l'aria, si infiamma alle condizioni definite nel metodo di prova.

1.3. Sostanze di riferimento

Non specificate.

1.4. Principio del metodo

L'autoinfiammabilità dei gas e dei vapori è determinata utilizzando l'apparecchiatura descritta in IEC-79-4.

1.5. Criteri di qualità

La ripetibilità varia in funzione dell'intervallo di temperature di autoaccensione e del metodo di prova utilizzato; al massimo ± 5 °C.

La sensibilità dipende dal metodo di prova utilizzato.

La specificità dipende dal metodo di prova utilizzato.

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Apparecchiatura*

L'apparecchiatura è descritta nel metodo di cui al punto 1.6.3.

1.6.2. *Condizioni di prova*

Un campione della sostanza in esame viene saggiato in conformità al metodo di cui al punto 1.6.3.

1.6.3. *Esecuzione della prova*

Vedi IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78 e BS 4056.

2. DATI

Registrare la temperatura di prova, la pressione atmosferica, la quantità del campione utilizzato e l'intervallo di tempo trascorso prima del verificarsi dell'accensione.

3. RELAZIONE

La relazione deve comprendere, se possibile, le seguenti informazioni:

— l'indicazione esatta della sostanza (*identificazione e impurezze presenti*);

— la quantità di campione utilizzato, la pressione atmosferica;

— i risultati delle misure effettuate (temperature di prova, risultati riguardanti l'eventuale accensione, corrispondenti intervalli di tempo);

— ogni ulteriore informazione e osservazione utili ai fini dell'interpretazione dei risultati.

4. BIBLIOGRAFIA

Nessuna.

———

A. 16. AUTOINFIAMMABILITÀ — SOLIDI — DETERMINAZIONE DELLA TEMPERATURA DI AUTOACCENSIONE RELATIVA

1. METODO

1.1. Introduzione

Non devono essere sottoposte a questa prova le sostanze esplosive e le sostanze che si infiammano spontaneamente a contatto con l'aria a temperatura ambiente.

Lo scopo della prova è di fornire informazioni preliminari sull'autoinfiammabilità di sostanze solide a temperature elevate.

Se il calore sviluppato dalla reazione della sostanza con l'ossigeno o dalla sua decomposizione esotermica non viene ceduto con sufficiente rapidità all'ambiente circostante, si ha un autoriscaldamento che porta all'autoaccensione. L'autoaccensione si verifica quindi quando la velocità di produzione di calore supera quella della sua dispersione.

Il procedimento è utile come saggio preliminare per le sostanze solide. Data la complessità dei processi di accensione e di combustione dei solidi, la temperatura di autoaccensione determinata con questo metodo deve essere utilizzata soltanto a fini di confronto.

1.2. Definizioni e unità

La temperatura di autoaccensione ottenuta secondo il presente metodo è la minima temperatura, espressa in °C, alla quale un dato volume di una sostanza si infiamma in determinate condizioni.

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo

In un forno a temperatura ambiente viene posto un certo volume della sostanza da esaminare; la temperatura del forno viene portata a 400 °C ad una velocità di 0,5 °C/min e contemporaneamente si registra la variazione della temperatura in funzione del tempo al centro del campione. Ai fini della presente prova, viene detta temperatura di autoaccensione la temperatura del forno alla quale la temperatura del campione raggiunge 400 °C per autoriscaldamento.

1.5. Criteri di qualità

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Apparecchiatura*

1.6.1.1. Forno

Forno da laboratorio a temperatura programmata (volume circa 2 l), con circolazione d'aria e provvisto di sfogo in caso di esplosione. Si deve fare in modo che gli eventuali gas di decomposizione non vengano in contatto con elementi riscaldati elettricamente per evitare rischi di esplosione.

1.6.1.2. Cubo di rete metallica

Ritagliare un pezzo di rete d'acciaio inossidabile con maglie di 0,045 mm secondo il modello riportato in figura 1 (vedi appendice). Piegare la rete e fissarla con filo metallico in modo da formare un cubo con la faccia superiore aperta.

1.6.1.3. Termocoppie

Termocoppie adatte allo scopo.

1.6.1.4. Registratore

Registratore a due canali, calibrato per temperature da 0 a 600 °C o per il voltaggio corrispondente.

1.6.2. *Condizioni di prova*

Le sostanze vengono sottoposte alla prova nella forma in cui vengono poste in commercio.

1.6.3. *Esecuzione della prova*

Il cubo viene riempito con la sostanza da esaminare, viene leggermente percosso su una superficie piana e viene aggiunta altra sostanza fino a quando il cubo è completamente pieno. Il campione viene quindi sospeso al centro del forno a temperatura ambiente. Una termocoppia viene posta al centro del cubo e l'altra tra il cubo e la parete del forno per registrare la temperatura del forno. La temperatura del forno dev'essere portata a 400 °C o al punto di fusione del solido, se inferiore a tale temperatura, ad una velocità di 0,5 °C/min; nel frattempo, le temperature del forno e del campione devono essere registrate con continuità. Quando la sostanza si infiamma, la termocoppia del campione mostrerà un brusco incremento di temperatura, che supererà la temperatura del forno.

2. DATI

Ai fini della valutazione finale, è necessaria la temperatura del forno alla quale la temperatura del campione raggiunge per autoriscaldamento i 400 °C (vedi figura 2 in appendice).

3. RELAZIONE

La relazione deve contenere, se possibile, le seguenti informazioni:

— descrizione della sostanza da esaminare,

— i risultati della determinazione, ivi compresa la curva temperatura/tempo,

— ogni ulteriore osservazione utile ai fini dell'interpretazione dei risultati.

4. BIBLIOGRAFIA

Nessuna.

———

Appendice

Figura 1

Modello di cubo di prova di 20 mm di lato

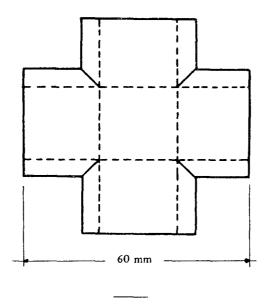
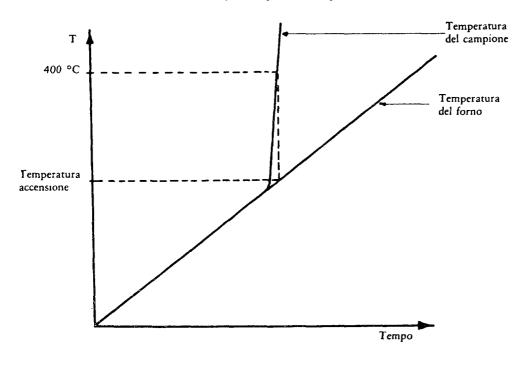



Figura 2

Curva tipica temperatura/tempo

A. 17. PROPRIETA OSSIDANTI

1. METODO

1.1. **Introduzione**

È utile avere informazioni preliminari sulle potenziali proprietà esplosive e tossiche della sostanza prima di effettuare la prova.

Questa prova non si applica ai liquidi e ai gas, alle sostanze esplosive o altamente infiammabili, ai perossidi organici o ai combustibili solidi suscettibili di fondere nelle condizioni della prova.

Questa prova è irrilevante quando l'esame delle formule di struttura stabilisce, al di là di ogni ragionevole dubbio, che la sostanza o il preparato non è suscettibile di reagire esotermicamente con materiale combustibile.

Per appurare se la prova debba essere condotta con precauzioni particolari, è opportuno effettuare un test preliminare.

1.2. **Definizioni ed unità**

Tempo di combustione: tempo di reazione, in secondi, riferito allo spostamento della zona di reazione lungo il cumulo, seguendo la procedura descritta nel punto 1.6.

Velocità di combustione: espressa in mm/s.

Velocità di combustione massima: il valore più elevato della velocità di combustione ottenuto con miscele contenenti dal 10 % al 90 %, in peso, di ossidante.

1.3. **Sostanza di riferimento**

Per la prova e per la prova preliminare si usa il nitrato di bario (grado analitico) come sostanza di riferimento.

Può anche essere usato, nelle prove preliminari, il dicromato di potassio.

Nell'utilizzare il dicromato di potassio vanno prese particolari precauzioni.

La miscela di riferimento è costituita da una miscela di nitrato di bario e di polvere di cellulosa, preparata secondo il punto 1.6, che presenta la massima velocità di combustione (di solito una miscela con il 60 % di nitrato di bario).

1.4. **Principio del metodo**

Una prova preliminare viene effettuata nell'interesse della sicurezza. La prova sarà sufficiente quando la prova preliminare indica chiaramente che la sostanza o il preparato di prova ha proprietà ossidanti. Diversamente, la sostanza o il preparato deve subire un'ulteriore prova.

Nell'ulteriore prova la sostanza di prova e la sostanza combustibile vengono miscelate in varie proporzioni. Si formano altrettanti cumuli con le varie miscele e si procede all'accensione di un'estremità di ognuno di essi. La velocità massima così determinata viene poi confrontata con la velocità massima di combustione di una miscela di riferimento.

1.5. **Criteri di qualità**

Qualsiasi metodo di macinazione e mescolamento è valido a condizione che la differenza fra le velocità massime di combustione in ciascuna delle 6 prove non differisca dal valore della media aritmetica di oltre il 10 %.

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. *Prova preliminare*

La sostanza, nella sua forma commerciale, e la cellulosa o la farina di legno vengono essiccate e grossolanamente mescolate nel rapporto di 2 a 1 in peso. Con la miscela si realizza un mucchietto di forma conica, con diametro di base di 3,5 cm e con altezza di 2,5 cm, riempiendo, senza schiacciare, un recipiente conico (ad esempio, un imbuto di vetro da laboratorio con il gambo tappato).

Il mucchietto è collocato su una superficie fredda, isolante e non conduttrice, sopra la sorgente di ignizione, formata da un filo di metallo inerte, come il platino od il nichel (che può essere riscaldato elettricamente a circa 1 000 °C). La sorgente è collocata approssimativamente 1 mm sopra la superficie di prova facendo in modo che attraversi la base del mucchietto. La prova è condotta sotto una cappa come descritto nel punto 1.6.3.

La sorgente di ignizione è lasciata accesa per tutta la durata della prova.

La forza e la durata della reazione risultante sono osservate ed annotate.

La sostanza o il preparato deve essere considerato ossidante se la reazione è vigorosa.

In ogni caso quando il risultato si presta a dubbi, è necessario completare il test complessivo descritto sopra.

1.6.2. *Preparazione*

1.6.2.1. Sostanza di prova

Ridurre il campione da esaminare in particelle di dimensioni inferiori a 0,125 mm, usando la seguente procedura:

Setacciare la sostanza di prova nel suo stato commerciale e macinare la frazione rimanente. Ripetere la procedura finché tutta la porzione di sostanza di prova sia passata attraverso il setaccio.

Per la macinatura e la setacciatura si può usare un qualsiasi apparato a condizione che vengano rispettati i criteri di qualità.

Prima di preparare la miscela, la sostanza deve essere essiccata e portata a peso costante a 105 °C. Se la temperatura di decomposizione della sostanza di prova è inferiore a 105 °C, essiccare ad un'opportuna temperatura piu bassa.

1.6.2.2. Sostanza combustibile

Come sostanza combustibile si usa la cellulosa in polvere del tipo impiegato per la cromatografia a strato sottile o su colonna. E risultato idoneo un tipo di cellulosa con fibre di lunghezza compresa per l'85 % tra 0,020 mm e 0,075 mm. La polvere di cellulosa viene fatta passare attraverso un setaccio a maglia da 0,120 mm.

Prima di preparare la miscela la cellulosa in polvere deve essere portata a peso costante a 105 °C.

Se viene usata farina di legno nella prova preliminare allora si prepara farina di legno dolce raccogliendo la porzione che passa attraverso un setaccio di 1 600 µm, si mescola a fondo, poi si essicca a 105 °C per quattro ore in uno strato non piu spesso di 25 mm. Si raffredda e si conserva in un recipiente a tenuta d'aria riempito al massimo possibile, preferibilmente entro 24 ore dall'essiccamento.

1.6.2.3. Miscela

Preparare miscele di ossidante e cellulosa contenenti dal 10 % al 90 %, in peso, di ossidante, aumentando ogni volta del 10 % il contenuto di quest'ultimo. Nei casi dubbi, per individuare con maggior precisione la velocità massima di combustione, possono essere impiegate miscele intermedie di cellulosa ed ossidante.

Nota

Le miscele di ossidante e di cellulosa, in quanto potenzialmente esplosive, vanno manipolate con la dovuta attenzione.

Il cumulo si forma con uno stampo di metallo lungo 250 mm ed avente una sezione trasversale triangolare alta 10 mm e larga 20 mm. Alle due estremità dello stampo vengono montate in senso longitudinale due lamiere sottili a guisa di bordi laterali, che sporgono di 2 mm dal bordo superiore della sezione triangolare (figura). Il dispositivo viene riempito, senza pressare, con un lieve eccesso della miscela. Dopo aver lasciato cadere la forma da un'altezza di 2 cm su una superficie solida, la sostanza in eccedenza viene raschiata con una lamina mantenuta in posizione obliqua. Si tolgono i bordi laterali e la polvere rimanente viene eliminata mediante un rullo. Si copre quindi lo stampo con una piastra non infiammabile, si capovolge il tutto e si toglie lo stampo.

1.6.2.4. Fonte di ignizione

Come fonte di ignizione si usa la fiamma di un becco a gas o un filo di platino riscaldato elettricamente a circa 1 000 °C.

1.6.3. *Condizioni sperimentali*

Sistemare il cumulo in una coppa.

La velocità di aspirazione dell'aria deve essere quella sufficiente a non far propagare i fumi nel laboratorio e non deve variare durante le prove. Uno schermo asciutto viene eretto attorno all'apparato.

A causa della igroscopicità della cellulosa e delle sostanze da analizzare, la prova deve essere effettuata il più rapidamente possibile.

Si accende ad una estremità il cumulo toccandolo con la fiamma o con il filo di platino incandescente. Si misura il tempo di combustione sulla lunghezza di 200 mm, dopo che la zona di reazione si è diffusa per 30 mm.

La prova è ripetuta per la sostanza di riferimento. La prova è quindi condotta con ognuna delle miscele della sostanza in prova con la cellulosa.

Se la velocità massima di combustione risulta significativamente più grande di quella della sostanza di riferimento, la prova può essere sospesa, altrimenti le tre miscele aventi le tre velocità più alte di combustione devono essere provate per altre 5 volte.

2. DATI

Per ragioni di sicurezza, il valore massimo della velocità di combustione e non il valore medio deve essere considerato come caratteristica della proprietà ossidante della sostanza in prova.

Ai fini della valutazione si prende in considerazione il più alto valore della velocità di combustione rilevato su una serie di 6 prove su una determinata miscela.

Riportare graficamente i valori più alti della velocità di combustione per ciascuna miscela in funzione del contenuto di ossidante.

Dal grafico si ricava la massima velocità di combustione.

I 6 valori della velocità di combustione ricavati da una serie di prove effettuate sulla miscela a velocità di combustione massima non devono differire di più del 10 % dal valore medio aritmetico. In caso contrario si devono migliorare i metodi di macinatura e di mescolamento.

Raffrontare la velocità massima di combustione ottenuta con la velocità massima di combustione della miscela di referimento (vedi punto 1.3).

3. RELAZIONI

3.1. **Relazione sulla prova**

Il rapporto, se possibile, includerà le seguenti informazioni:

— una descrizione della sostanza in prova,

— ogni trattamento del campione (ad esempio, macinazione, essiccamento),

— i risultati delle misure,

— la maniera in cui è avvenuta la reazione (ad esempio, fiammata in superficie, combustione attraverso tutta la massa, ogni informazione concernente i prodotti di combustione),

— ogni osservazione aggiuntiva rilevante per l'interpretazione dei risultati, che include una descrizione della forza della reazione (la miscela arde, scintilla, esala, arde lentamente senza fiamma, ecc.) e la durata approssimativa avuta in modo omogeneo nella prova preliminare di sicurezza — di screening — per la sostanza in prova e di riferimento.

3.2. **Interpretazione dei risultati**

Una sostanza è considerata come ossidante quando:

a) nella prova preliminare c'è una reazione rilevante,

b) nella prova, la velocità massima di combustione delle miscele analizzate è maggiore o uguale alla velocità di combustione della miscela di cellulosa e di nitrato di bario.

4. **BIBLIOGRAFIA**

Nessuna.

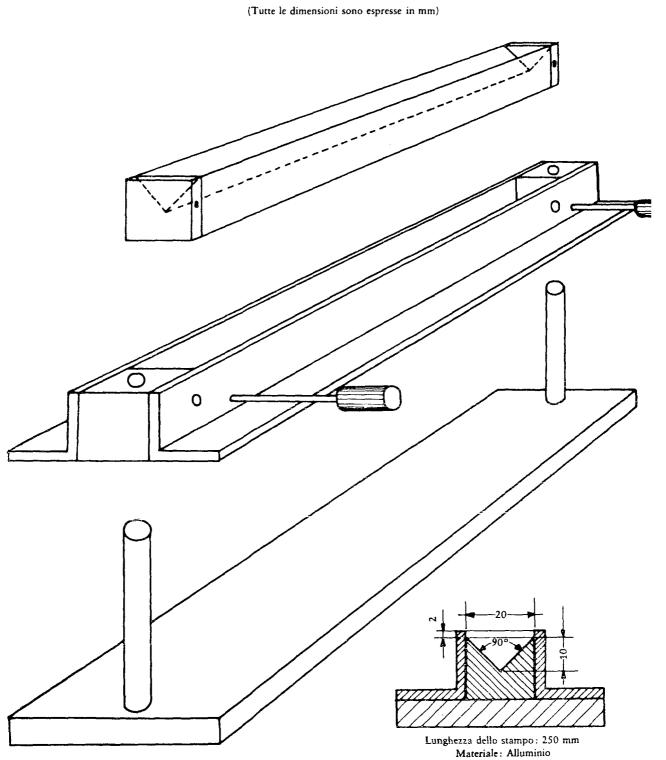
———

Appendice

Figura

Stampo e accessori per la preparazione del campione

(Tutte le dimensioni sono espresse in mm)

Lunghezza dello stampo: 250 mm
Materiale: Alluminio

PARTE B: METODI DI DETERMINAZIONE DELLA TOSSICITÀ

INTRODUZIONE GENERALE: PARTE B

A. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale.

B. DEFINIZIONI

i) La *tossicità acuta* comprende gli effetti avversi che si verificano entro un dato tempo (in genere 14 giorni) dalla somministrazione di una singola dose di sostanza.

ii) La *DL_{50}* (dose letale mediana) è la dose singola di una sostanza, valutata statisticamente, che si prevede causi la morte nel 50 % degli animali trattati. Il valore della DL_{50} viene espresso in termini di peso della sostanza saggiata per unità di peso dell'animale usato per il saggio (mg/kg).

iii) La *CL_{50}* (concentrazione letale mediana) è la concentrazione di una sostanza, valutata statisticamente, che si può prevedere causi morte durante l'esposizione o entro un determinato tempo, consecutivo all'esposizione, del 50 % degli animali esposti per un periodo determinato. Il valore della CL_{50} viene espresso in termini di peso della sostanza in esame per volume standard di aria (mg/l).

iv) Il *livello senza effetti tossici* è la dose o il livello di esposizione massimo, usato in un saggio, che non produce effetti avversi individuabili.

v) La *tossicità subacuta/subcronica* comprende gli effetti avversi che si verificano negli animali del saggio come conseguenza della somministrazione ripetuta quotidianamente di una dose o di una esposizione ripetuta quotidianamente a una sostanza chimica per una breve parte della loro prevista durata di vita.

vi) La *dose massima tollerata* (DMT) è il livello massimo di dose che provoca segni di tossicità senza avere maggiori effetti sulla sopravvivenza, in relazione al saggio in cui viene usata.

vii) L'*irritazione cutanea* è la produzione di cambiamenti infiammatori reversibili nella cute a seguito di applicazione di una sostanza in esame.

viii) L'*irritazione oculare* è la produzione di cambiamenti reversibili nell'occhio a seguito dell'applicazione di una sostanza in esame alla superficie anteriore dell'occhio.

ix) La *sensibilizzazione cutanea* (dermatite allergica da contatto) è una reazione cutanea ad una sostanza mediata da fattori immunologici.

C. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE

Nella valutazione e nell'interpretazione dei saggi sperimentali si deve tener presente che vi sono limitazioni nella estrapolabilità direttamente all'uomo dei saggi su animali e *in vitro*.

I dati relativi all'uomo, quando disponibili, sono considerati più pertinenti per la determinazione degli effetti potenziali delle sostanze chimiche sulla popolazione umana.

MUTAGENICITA (incluso il pre-screening di cancerogenicità)

Per la valutazione preliminare del potenziale mutageno di una sostanza, è necessario ottenere informazioni su due categorie di effetti terminali, ossia mutazione genica e aberrazioni cromosomiche.

Questi due tipi di effetti terminali vengono valutati mediante i seguenti saggi:

i) saggi di induzione di mutazioni geniche (puntiformi) in cellule procariotiche quali *Salmonella typhimurium*; saggi basati sull'impiego dell'*Escherichia coli* sono anche accettabili. La scelta tra questi due organismi di saggio può essere determinata dalla natura della sostanza chimica da saggiare;

ii) saggi di induzione di aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero coltivate *in vitro*; è anche accettabile una procedura *in vivo* (saggio del micronucleo o saggio dell'analisi metafasica delle cellule di midollo osseo).

D. BIBLIOGRAFIA

La tossicologia è una scienza sperimentale in evoluzione e su ogni argomento esiste una notevole letteratura. Per le informazioni pertinenti si rinvia alle linee guida per i saggi elaborati dall'OCSE.

Note aggiuntive

Cura degli animali

Nelle prove di tossicità sono essenziali un severo controllo delle condizioni ambientali e tecniche adeguate alla cura degli animali.

i) Condizioni di stabulazione

Le condizioni ambientali nei locali o nei luoghi in cui sono alloggiati gli animali da laboratorio dovrebbero essere idonee per le specie di saggio. Per i roditori, condizioni adatte sono una temperatura ambientale di 22 °C (± 3 °C) con una umidità relativa del 30—70 % ; per i conigli e i porcellini d'India, la temperatura dovrebbe essere di 20 °C (± 3 °C) con un'umidità relativa del 30—70 %.

Alcune tecniche sperimentali sono particolarmente sensibli agli effetti della temperatura e, in tali casi, nella descrizione del metodo di saggio sono inclusi i dati particolareggiati delle condizioni opportune. In tutte le indagini sugli effetti tossici, la temperatura e l'umidità dovrebbero essere controllate, registrate e incluse nella relazione finale dello studio.

Quando l'illuminazione sia artificiale, la sequenza dovrebbe essere normalmente di 12 ore di luce e di 12 ore di buio. I particolari dello schema di illuminazione dovrebbero essere registrati e inclusi nella relazione finale dello studio.

Nelle relazioni sugli esperimenti effettuati su animali, è importante indicare il tipo di gabbie usate e il numero degli animali ospitati in ciascuna gabbia sia durante l'eposizione alla sostanza chimica che durante qualsiasi successivo periodo di osservazione.

ii) Condizioni di alimentazione

Le diete dovrebbero soddisfare tutte le necessità nutrizionali della specie utilizzata per il saggio. Qualora le sostanze siano somministrate agli animali nella loro dieta, il valore nutrizionale potrebbe essere ridotto da interazione fra la sostanza e un costituente della dieta.

La possibilità di una tale reazione dovrebbe essere considerata quando i risultati dei saggi vengono interpretati.

I contaminanti della dieta noti per influenzare la tossicità non dovrebbero essere presenti in concentrazioni tali da interferire.

B. 1. TOSSICITA ACUTA PER VIA ORALE

1. METODO

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principio del metodo di saggio**

La sostanza da saggiare viene somministrata per via orale mediante tubo gastrico in dosi graduate (una dose per gruppo) a vari gruppi di animali. Vengono quindi osservati gli effetti e gli eventi letali. Gli animali morti durante il saggio vengono sottoposti a necroscopia e, a conclusione del saggio, si procede alla necroscopia di quelli rimasti in vita. Questo metodo riguarda principalmente gli studi sui roditori.

1.5. **Criteri di qualità**

Nessuno.

1.6. **Descrizione del metodo di saggio**

1.6.1. *Preparazioni*

Prima del saggio gli animali sono mantenuti nelle condizioni di stabulazione e di alimentazione dell'esperimento per un periodo di almeno 5 giorni. Prima del saggio giovani animali adulti e sani sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi sperimentali. Se necessario, la sostanza in esame viene sciolta o sospesa in veicolo adatto. Si raccomanda di considerare, ogni volta possibile, come prima scelta una soluzione acquosa, seguita da una soluzione in olio vegetale e quindi in altri veicoli o una sospensione. Per i veicoli non acquosi, le caratteristiche pertinenti di tossicità del veicolo dovrebbero essere note o, in caso contrario, dovrebbero essere determinate prima o durante il saggio. Nei roditori, generalmente il volume non dovrebbe superare 10 ml/kg di peso corporeo, a meno che non vengano utilizzate soluzioni acquose, nel qual caso si possono raggiungere 20 ml/kg. La variabilità del volume di saggio dovrebbe essere ridotta al minimo, regolando la concentrazione per assicurare la somministrazione di un volume costante a tutti i dosaggi.

1.6.2. *Condizioni per il saggio*

1.6.2.1. Animali per l'esperimento

Salvo controindicazioni, il ratto è la specie d'elezione.

Si dovrebbero utilizzare ceppi di laboratorio comunemente usati. Per ciascun sesso, l'intervallo della variazione ponderale degli animali utilizzati in un saggio non dovrebbe superare più o meno il 20 % del valore medio pertinente.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ciascun dosaggio vengono utilizzati almeno 10 roditori (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile). Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide.

1.6.2.3. Livelli di dosaggio

Questi dovrebbero essere in numero sufficiente, almeno tre, opportunamente intervallati per produrre nei gruppi trattati una graduazione di effetti tossici e di eventi letali. I risultati dovrebbero essere sufficienti per fornire una curva dose-risposta e, quando possibile, permettere un'accettabile determinazione della DL_{50}.

1.6.2.4. Saggio limite

Una valutazione adeguata del potenziale acuto tossico si considera raggiunta nella maggior parte dei casi se, entro 14 giorni dalla somministrazione di una dose di 5 000 mg/kg di peso corporeo, nessun evento mortale dipendente dal composto in esame viene osservato nel gruppo di animali trattati (5 animali per sesso).

1.6.2.5. Periodo di osservazione

Il periodo di osservazione dovrebbe essere di almeno 14 giorni. Tuttavia, tale durata non dovrebbe essere tassativa. Essa dovrebbe dipendere dalla natura delle reazioni tossiche, dalla velocità del loro insorgere e dalla durata del periodo di recupero; essa può quindi essere estesa, se considerato necessario. Il momento in cui compaiono e scompaiono i segni di tossicità e il momento in cui sopraggiunge la morte sono importanti, soprattutto quando esiste una tendenza della sostanza in esame a causare una morte ritardata.

1.6.3. *Procedimento*

Prima della somministrazione della sostanza in esame, gli animali dovrebbero essere tenuti a digiuno. Al ratto non dovrebbe essere somministrato cibo durante la notte prima dell'esperimento; per animali con metabolismo più veloce, un periodo di digiuno più breve è adeguato; l'acqua è disponibile *ad libitum*.

Il giorno successivo si dovrebbe procedere alle operazioni di pesatura degli animali e quindi alla somministrazione della sostanza in singole dosi a gruppi di animali mediante un tubo gastrico.

Qualora non sia possibile somministrare tutta la quantità con una singola dose, si può procedere alla somministrazione ripetuta di frazioni più piccole della stessa durante un periodo non superiore alle 24 ore. A somministrazione della sostanza avvenuta, il cibo può essere sospeso per altre 3 – 4 ore. Nel caso di una dose somministrata in frazioni durante un certo periodo di tempo, può essere necessario fornire agli animali cibo e acqua in misura dipendente dalla durata del periodo di somministrazione. Dopo la somministrazione, si effettuano osservazioni e si registrano sistematicamente i risultati per ogni singolo animale. Durante il primo giorno, le osservazioni dovrebbero essere frequenti.

Un attento esame clinico dovrebbe essere effettuato almeno una volta al giorno per 5 giorni per settimana. Altre osservazioni dovrebbero essere effettuate quotidianamente con azioni adeguate per minimizzare la perdita di animali dell'esperimento, ad esempio, necroscopia oppure refrigerazione degli animali deceduti e isolamento o sacrificio degli animali deboli o moribondi. Le osservazioni effettuate dovrebbero tenere conto dei cambiamenti della pelle e del pelo, degli occhi e delle membrane mucose, e anche del sistema respiratorio, circolatorio, nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del quadro comportamentale. Particolare attenzione dovrebbe essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Il momento in cui sopraggiunge il decesso dell'animale dovrebbe essere registrato con la massima precisione possibile.

Gli animali che muoiono durante il saggio e quelli che sopravvivono alla fine dello stesso sono sottoposti a necroscopia. Tutti i cambiamenti patologici macroscopici dovrebbero essere registrati. Ove opportuno, si dovrebbero prelevare tessuti per l'esame istopatologico.

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti in una tabella indicante per ogni gruppo di saggio il numero di animali all'inizio del saggio, il momento del decesso di ciascun animale, il numero di animali che presentano altri

segni di tossicità, la descrizione degli effetti tossici e i risultati della necroscopia. Il peso di ciascun animale dovrebbe essere determinato e registrato poco prima della somministrazione della sostanza, quindi, ogni settimana e al momento del decesso. Le variazioni di peso dovrebbero essere calcolate e registrate quando la sopravvivenza dell'animale supera un giorno. La DL_{50} può essere determinata con un metodo riconosciuto. La valutazione dei dati dovrebbe includere il rapporto, se esistente, tra l'esposizione degli animali alla sostanza in esame e l'incidenza e gravità di tutte le anormalità, incluse quelle comportamentali e cliniche, lesioni macroscopiche, variazioni del peso corporeo, la mortalità e qualsiasi altro effetto tossico.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Le relazioni sul saggio dovrà, se possibile, contenere le seguenti informazioni:

- specie, ceppo, origine degli animali usati, condizioni ambientali, dieta, ecc.,
- condizioni dell'esperimento,
- livelli di dosaggio (con veicolo, se usato, e concentrazione),
- tabulato dei dati risposta per sesso e livello di dosaggio (cioè numero di animali morti, numero di animali che presentano segni di tossicità, numero di animali esposti),
- tempo intercorso tra la somministrazione della sostanza e la morte,
- osservazioni sugli animali,
- valore della DL_{50} per ciascun sesso determinato a 14 giorni (specificando il metodo di determinazione),
- intervallo di confidenza statistica del 95 % per la DL_{50},
- curva dose-mortalità e relativo coefficiente angolare (se il metodo di determinazione lo consente),
- risultati dell'esame necroscopico,
- qualsiasi reperto istopatologico,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione e interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

B. 2. TOSSICITÀ ACUTA PER INALAZIONE

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

Diversi gruppi di animali per l'esperimento sono esposti a concentrazioni graduate della sostanza in esame per un determinato periodo di tempo (si utilizza una sola concentrazione per gruppo). Si procede poi all'osservazione degli effetti e degli eventi letali. Gli animali che muoiono durante l'esperimento sono sottoposti a necroscopia e quelli che sopravvivono sono sottoposti a necroscopia alla fine dell'esperimento.

1.5. Criteri di qualità

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

1.6.1. *Preparazioni*

Prima del saggio gli animali sono tenuti nelle condizioni di stabulazione e di alimentazione dell'esperimento per un periodo di almeno 5 giorni. Prima del saggio giovani animali adulti e sani sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi necessari per il saggio. Non è necessario sottoporre gli animali a una esposizione simulata, a meno che ciò non sia richiesto dal tipo di dispositivo utilizzato per l'esposizione.

Ove necessario, alla sostanza in esame può essere aggiunto un veicolo idoneo per facilitare una concentrazione appropriata della sostanza in esame nell'atmosfera e, quindi, per il veicolo deve essere utilizzato un gruppo di controllo. Se per facilitare il dosaggio si impiega un veicolo o altri additivi, questi non dovrebbero produrre effetti tossici. Se appropriato, dati storici possono essere utilizzati.

1.6.2. *Condizioni per il saggio*

1.6.2.1. Animali per l'esperimento

Salvo controindicazioni, il ratto è la specie d'elezione. Si dovrebbero utilizzare ceppi di laboratorio comunemente usati. Per ciascun sesso la variazione ponderale degli animali utilizzati in un saggio non dovrebbe superare del ± 20 % il valore medio pertinente.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ogni livello di concentrazione vengono utilizzati almeno dieci roditori (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile). Le femmine dovrebbebero essere nullipare e non gravide.

1.6.2.3. Concentrazioni per l'esposizione

Queste dovrebbero essere in numero sufficiente, almeno tre, e opportunamente intervallate, onde produrre nei gruppi trattati una graduazione di effetti tossici e di eventi letali. I risultati dovrebbero essere sufficienti per fornire una curva mortalità-concentrazione e, quando possibile, permettere un accettabile determinazione della CL_{50}.

1.6.2.4. Saggio limite

Se un'esposizione di 5 animali maschi e di 5 animali femmine per 4 ore a 20 mg/l di un gas o a 5 mg/l di un aerosol o di una sostanza particellata o, se ciò non è possibile a causa di proprietà fisiche o chimiche (incluse quelle esplosive) della sostanza in esame, la concentrazione massima raggiungibile non provoca entro 14 giorni nessun evento letale dipendente dal composto in esame nel gruppo degli animali trattati, ulteriori saggi possono non ritenersi necessari.

1.6.2.5. Tempo di esposizione

Il periodo minimo di esposizione dovrebbe essere di 4 ore.

1.6.2.6. Dispositivi

Gli animali dovrebbero essere sottoposti all'esperimento con dispositivi per l'inalazione appositamente progettati per consentire un flusso d'aria dinamico di almeno 12 ricambi d'aria all'ora, per assicurare un adeguato contenuto di ossigeno e un'atmosfera di esposizione distribuita uniformemente. Qualora sia usata una camera, essa dovrebbe essere progettata in modo da evitare l'affollamento degli animali da esperimento e al tempo stesso rendere massima l'esposizione alla sostanza in esame mediante inalazione. Come regola generale, onde garantire la stabilità dell'atmosfera nella camera, il «volume» complessivo degli animali del saggio non dovrebbe superare il 5 % di quello della camera di saggio. Si può ricorrere ad una esposizione oro-nasale, della sola testa o di tutto il corpo in camera singola; le prime due modalità di esposizione aiuteranno a rendere minimo l'assorbimento delle sostanze attraverso altre vie.

1.6.2.7. Periodo di osservazione

Il periodo di osservazione dovrebbe essere di almeno 14 giorni. Tuttavia la durata dell'osservazione non dovrebbe essere fissata rigidamente. Essa dovrebbe essere determinata dalla natura delle reazioni tossiche, dalla velocità del loro insorgere e dalla durata del periodo di recupero; essa può, quindi, essere estesa se considerato necessario. Il momento in cui si manifestano e scompaiono i sintomi di tossicità e quello nel quale interviene il decesso, sono importanti, soprattutto quando esiste una tendenza della sostanza a causare una morte ritardata.

1.6.3. *Procedimento*

Gli animali sono pesati poco prima dell'esposizione e quindi esposti alla concentrazione di saggio nell'apposito dispositivo, per un periodo minimo di 4 ore, dopo aver effettuato l'equilibramento della concentrazione nella camera di inalazione. Il tempo di equilibramento dovrebbe essere breve. Il saggio dovrebbe essere effettuato ad una temperatura di 22 °C ± 3 °C. Da un punto di vista ottimale l'umidità relativa dovrebbe essere mantenuta tra il 30 e il 70 % ma, in taluni casi (ad esempio, prove di aerosol), cio puo non essere realizzabile. Durante l'esposizione, la somministrazione di cibo e acqua dovrebbe essere sospesa. Dovrebbe essere utilizzato un sistema dinamico di inalazione con un adeguato sistema analitico di controllo della concentrazione. Si raccomanda di effettuare un esperimento di prova per stabilire le concentrazioni idonee di esposizione. Il sistema dovrebbe assicurare il raggiungimento al più presto possibile di concentrazioni di esposizione stabili. La velocità di flusso d'aria dovrebbe essere regolata in modo da assicurare uniformi condizioni nell'intera camera di esposizione.

Dovrebbero essere misurati o controllati:

a) la velocità del flusso d'aria (continuamente);

b) la concentrazione effettiva della sostanza in esame nella zona di respirazione. Durante il periodo di esposizione la concentrazione non dovrebbe variare più o meno del 15 % del valore medio. Tuttavia, nel caso di polveri e di alcuni aerosol, questo livello di controllo potrebbe non essere realizzabile, per cui una variazione superiore dovrebbe quindi essere accettabile. Per particelle e aerosol, l'analisi dovrebbe essere effettuata con la frequenza necessaria, e almeno una volta, per determinare la distribuzione della grandezza delle particelle;

c) la temperatura e l'umidità;

d) durante e dopo l'esposizione, si procede all'effettuazione e alla registrazione sistematica delle osservazioni effettuate; registrazioni individuali dovrebbero essere tenute per ciascun animale. Durante il primo giorno le osservazioni dovrebbero essere frequenti. Un attento esame clinico dovrebbe essere effettuato almeno una volta al giorno per cinque giorni per settimana. Altre osservazioni dovrebbero essere effettuate quotidianamente con azioni appropriate per minimizzare la perdita di animali da studiare, ad esempio necroscopia e refrigerazione degli animali trovati morti e isolamento o sacrificio degli animali deboli e moribondi.

   Le osservazioni dovrebbero comprendere i cambiamenti della pelle e del pelo, degli occhi, delle membrane mucose e del sistema respiratorio, circolatorio, nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento dell'animale. Particolare attenzione dovrebbe essere rivolta all'osservazione del comportamento respiratorio, di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Il momento in cui sopraggiunge il decesso dell'animale dovrebbe essere registrato con la massima precisione possibile. I valori ponderali degli animali dovrebbero essere determinati settimanalmente dopo l'esposizione e al momento del decesso. Gli animali che muoiono durante il saggio e quelli che sopravvivono a conclusione dello stesso sono sottoposti a necroscopia con particolare riferimento ai cambiamenti intervenuti nel tratto respiratorio superiore e inferiore. Si dovrebbero registrare tutti i cambiamenti patologici macroscopici. Ove del caso, i tessuti dovrebbero essere prelevati per l'esame istopatologico.

2. DATI

I dati dovrebbero essere riassunti in una tabella indicante per ogni gruppo di saggio il numero di animali all'inizio del saggio, il momento del decesso di ciascun animale, il numero di animali che presentano altri segni di tossicità, la descrizione degli effetti tossici e i risultati della necroscopia. Le variazioni ponderali dovrebbero essere calcolate e registrate quando la sopravvivenza sia superiore ad un giorno. La CL_{50} dovrebbe essere determinata con un metodo riconosciuto. La valutazione dei dati dovrebbe comprendere il rapporto, se esistente, tra l'esposizione degli animali alla sostanza in esame e l'incidenza e gravità di tutte le anormalità incluse quelle comportamentali e cliniche, lesioni macroscopiche, variazione del peso corporeo, mortalità e qualsiasi altro effetto tossico.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

La relazione sul saggio dovrà, se possibile, contenere le seguenti informazioni:

— specie, ceppo, origine degli animali, condizioni ambientali, dieta, ecc.;

— condizioni del saggio:

   Descrizione del dispositivo usato per l'esposizione che includa il modello, il tipo, le dimensioni, la provenienza dell'aria, il sistema per la formazione di particelle e aerosol, il metodo per il condizionamento dell'aria, il sistema di alloggiamento degli animali nella camera (quando essa viene utilizzata). Si dovrebbe procedere anche alla descrizione dell'attrezzatura per il rilevamento della temperatura, dell'umidità, delle concentrazioni e dimensioni delle particelle di aerosol.

   Dati sull'esposizione:

   Questi dati dovrebbero essere raccolti in tabelle e presentati con i valori medi e con una misura di variabilità (ad esempio, deviazione standard) e dovranno, se possibile, includere:

   a) velocità del flusso d'aria attraverso l'apparecchiatura di inalazione,

   b) temperatura e umidità dell'aria,

c) concentrazioni nominali (quantitativo globale della sostanza in esame introdotta nel dispositivo per l'inalazione diviso per il volume d'aria),

d) natura dell'eventuale veicolo, se usato,

e) concentrazioni effettive nella zona di respirazione,

f) dimensioni mediane delle particelle,

g) periodo di equilibratura,

h) periodo di esposizione;

— tabulazione dei risultati per sesso e livello di esposizione (cioè numero di animali che muoiono, numero di animali che presentato sintomi di tossicità; numero di animali esposti);

— momento in cui e intervenuto il decesso durante o dopo l'esposizione;

— osservazioni sugli animali;

— CL_{50} per ciascun sesso determinata alla fine del periodo di osservazione (specificando il metodo di calcolo);

— intervallo di confidenza statistica del 95 % per la CL_{50};

— curva dose-mortalità e relativo coefficiente angolare (se il metodo di determinazione lo consente);

— risultati dell'esame necroscopico;

— qualsiasi risultato istopatologico;

— discussioni dei risultati;

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione e interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

———

B. 3. TOSSICITA ACUTA PER VIA CUTANEA

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principo del metodo di saggio

La sostanza in esame viene applicata in dosaggi graduati, in ragione di una dose per gruppo, sulla pelle di vari gruppi di animali di saggio. Si procede poi all'osservazione degli effetti e degli eventi letali. Gli animali che durante il saggio sono sottoposti a necroscopia e i sopravvissuti lo sono a conclusione del saggio.

1.5. Criteri di qualità

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo adottato per il saggio

1.6.1. *Preparazioni*

Per almeno cinque giorni prima dell'esperimento, gli animali sono tenuti nelle gabbie usate per il saggio nelle condizioni di stabulazione e di alimentazione dell'esperimento. Prima del saggio, giovani animali adulti e sani sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi sperimentali. Circa 24 ore prima del saggio, si effettua il taglio o la rasatura del pelo nella parte dorsale del corpo della cavia. Durante le operazioni di taglio o rasatura, si deve badare a non scorticare la pelle dell'animale per evitarne l'abrasione che potrebbe alterarne la permeabilità.

Si dovrebbe preparare almeno il 10 % della superficie corporea per l'applicazione della sostanza in esame. Le sostanze solide, che potranno essere eventualmente ridotte in polvere, dovrebbero essere inumidite con acqua o, se necessario, con un veicolo adatto ad assicurare un buon contatto con la pelle. Se un veicolo viene utilizzato, si dovrebbe tener conto dell'influenza dello stesso sulla penetrazione cutanea della sostanza in esame. Le sostanze liquide generalmente vengono saggiate senza diluizione.

1.6.2. *Condizioni del saggio*

1.6.2.1. Animali per l'esperimento

Possono essere utilizzati ratti o conigli adulti. Si possono utilizzare altre specie animali, ma il loro uso dovrebbe essere giustificato. Dovrebbero essere utilizzati ceppi di laboratorio comunemente usati. Per ciascun sesso la variazione di peso degli animali utilizzati dovrebbe essere limitata a ± 20 % del pertinente valore medio.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ciascun livello di dosaggio dovrebbero essere usati almeno 10 animali (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile) con pelle sana e intatta. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. L'uso di un numero inferiore di animali può essere a volte giustificato, specialmente nel caso del coniglio.

1.6.2.3. Livelli di dosaggio

Questi dovrebbero essere in numero sufficiente, almeno 3, e adeguatamente intervallati per produrre uno spettro di effetti tossici e di tassi di mortalità. Nel decidere i dosaggi occorrerebbe tener presente qualsiasi effetto irritante o corrosivo. I dati dovrebbero essere sufficienti per ottenere una curva dose-risposta e, quando possibile, permettere una determinazione accettabile della DL_{50}.

1.6.2.4. Saggio limite

Qualora in un saggio preliminare, una dose di 2 000 mg/kg peso corporeo o più, applicata alla pelle intatta di almeno cinque animali per sesso, non produca entro 14 giorni eventi letali dipendenti dalla sostanza, ulteriori saggi con altri dosaggi possono essere considerati non necessari.

1.6.2.5. Periodo di osservazione

Il periodo di osservazione dovrebbe essere di almeno 14 giorni. Tuttavia tal durata dovrebbe essere non tassativa. Essa dovrebbe dipendere dalla natura delle reazioni tossiche, dalla velocità della loro insorgenza e dalla lunghezza del periodo di guarigione; se necessario, quindi, essa potrà essere prolungata. Il momento in cui compaiono e spariscono i segni di tossicità, la loro durata e il momento in cui interviene il decesso, sono importanti soprattutto nel caso in cui la sostanza tenda a causare una morte ritardata.

1.6.3. *Procedimento*

Ogni gabbia deve contenere un solo animale. La sostanza in esame dovrebbe essere applicata uniformemente su una superficie pari a circa il 10 % della superficie corporea totale. Per le sostanze altamente tossiche, la superficie può essere inferiore, ma dovrà essere ricoperta da uno strato per quanto possibile sottile e uniforme.

Durante il periodo di esposizione di 24 ore, le sostanze in esame dovrebbero essere tenute a contatto diretto della pelle mediante una garza porosa e un cerotto non irritante. La parte su cui viene applicata la sostanza dovrebbe essere ulteriomente coperta in modo opportuno per tenere ferma la garza e la sostanza in esame e assicurare che gli animali non ingeriscano la sostanza stessa. Dispositivi per la limitazione dei movimenti possono essere usati per impedire agli animali di ingerire la sostanza in esame, ma l'immobilizzazione completa non è consigliabile.

Alla fine del periodo di esposizione si dovrebbe rimuovere la sostanza residua utilizzando acqua, se possibile, o altri prodotti idonei per la pulizia della pelle.

Le osservazioni dovrebbero essere registrate sistematicamente non appena fatte, badando a tenere separati i dati per ciascun animale. Durante il primo giorno le osservazioni dovrebbero essere frequenti. Un attento esame clinico dovrebbe essere effettuato almeno una volta al giorno per 5 giorni per settimana. Le altre osservazioni dovrebbereo essere effettuate quotidianamente con azioni appropriate per minimizzare la perdita di animali da studiare, ad esempio, necroscopia o refrigerazione degli animali trovati morti e isolamento o sacrificio degli animali deboli o moribondi. Le osservazioni dovrebbero tener conto dei cambiamenti intervenuti nel pelo, nella pelle trattata, negli occhi e nelle membrane mucose e anche nel sistema respiratorio, circolatorio, nel sistema nervoso autonomo e centrale, nell'attività somatomotoria e nel comportamento dell'animale. Particolare attenzione dovrebbe essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Il momento in cui soppraggiunge il decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile. Gli animali che muoiono durante il saggio e quelli che sopravvivono alla fine del saggio sono sottoposti a necroscopia. Tutte le variazioni patologiche macroscopiche dovrebbero essere registrate. Ove del caso, dovrebbero essere prelevati tessuti per l'esame istopatologico.

2. DATI

I risultati dovrebbero essere riassunti in forma tabulare indicante per ogni singolo gruppo di saggio il numero di animali presenti all'inizio del saggio, il momento del decesso di ciascun animale, il numero di animali che presentano altri segni di tossicità, la descrizione degli effetti tossici e i risultati della necroscopia. Il peso di ciascun animale dovrebbe essere determinato e registrato poco prima dell'applicazione della sostanza, poi settimanalmente e al momento del decesso; le variazioni ponderali dovrebbero essere calcolate e registrate quando la sopravvivenza sia superiore a un giorno. La DL_{50} dovrebbe essere determinata con un metodo riconosciuto. La valutazione dei dati dovrebbe includere una valutazione del rapporto, se esistente, fra l'esposizione degli animali alla sostanza in esame e l'incidenza e la gravità di tutte le anormalità, incluse quelle comportamentali e cliniche, lesioni macroscopiche, cambiamenti del peso corporeo, mortalità e qualsiasi altro effetto tossico.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

La relazione sul saggio dovrà, se possibile, contenere le seguenti informazioni:

- specie, ceppo, origine degli animali, condizioni ambientali, dieta, ecc.,
- condizioni sperimentali (inclusa la tecnica per la pulizia della pelle),
- livelli di dosaggio (con veicolo, se usato, e concentrazioni),
- tabulato dei dati risposta per sesso e dosaggio (cioè numero di animali morti, numero di animali che presentano segni di tossicità, numero di animali esposti),
- tempo intercorso tra la somministrazione della sostanza e la morte,
- osservazioni sugli animali,
- valore della DL_{50} per ciascun sesso determinata a 14 giorni, specificando il metodo di determinazione,
- intervallo di confidenza statistica del 95 % per la DL_{50} (se può essere dato),
- curva dose-moralità e relativo coefficiente angolare (se il metodo di determinazione lo consente),
- risultati necroscopici,
- qualsiasi altro reperto istopatologico,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione e interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

B. 4. TOSSICITA ACUTA

IRRITAZIONE CUTANEA

1. METODO

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principio del metodo di saggio**

La sostanza da saggiare viene applicata in dose unica sulla pelle di alcuni animali da esperimento, ognuno dei quali funge come proprio controllo. Dopo un determinato intervallo, si osserva e valuta il grado di irritazione, che viene ulteriormente descritto per fornire una completa valutazione degli effetti. La durata delle osservazioni dovrebbe essere sufficiente per valutare completamente la reversibilità degli effetti osservati.

1.5. **Criteri di qualità**

Nessuno.

1.6. **Descrizione del metodo di saggio**

1.6.1. *Preparazioni*

Circa 24 ore prima del saggio, si dovrebbe effettuare il taglio o la rasatura del pelo nella parte dorsale del corpo dell'animale.

Durante le operazioni di taglio o rasatura, si dovrebbe badare a non scorticare la pelle dell'animale. Si dovrebbero utilizzare soltanto animali con pelle sana e intatta.

Le sostanze da saggiare che sono solide (che potranno essere eventualmente ridotte in polvere, se necessario), dovrebbero essere inumidite con acqua o, se necessario, con un veicolo adatto ad assicurare un buon contatto con la pelle. Nell'utilizzare un veicolo, si dovrebbe tener conto dell'influenza dello stesso sull'irritazione cutanea causata dalla sostanza in esame. Di norma, le sostanze liquide sono usate senza diluizione. A causa delle loro prevedibili proprietà corrosive, le sostanze fortemente acide o alcaline non devono necessariamente essere sottoposte al saggio di irritazione cutanea primaria. Questo tipo di saggio può essere superfluo per le sostanze riconosciute altamente tossiche per via cutanea.

1.6.2. *Condizioni del saggio*

1.6.2.1. Animali per l'esperimento

Sebbene si possano usare parecchi specie di mammiferi, il coniglio albino è la specie preferibile.

1.6.2.2. Numero di animali

Almeno 3 animali adulti e sani sono utilizzati. Altri animali possono risultare necessari per chiarire risposte ambigue.

1.6.2.3. Livelli di dosaggio

Salvo controindicazioni, sulla parte prescelta si applicano 0,5 ml di sostanza liquida oppure 0,5 g di sostanza solida o semisolida. Non è necessario avere un gruppo di controllo non trattato. Le zone cutanee adiacenti non trattate di ciascun animale servono come controllo per il saggio.

1.6.2.4. Periodo di osservazione

Il periodo di osservazione non dovrebbe essere fissato in modo rigido. Esso dovrebbe essere sufficiente per valutare completamente la reversibilità o l'irreversibilità degli effetti osservati, ma normalmente non è necessario superare i 14 giorni dall'applicazione.

1.6.3. *Procedimento*

Ogni gabbia dovrebbe contenere un solo animale. La sostanza da saggiare dovrebbe essere applicata su una piccola area (di circa 6 cm^2) della pelle e ricoperta da una garza assicurata con un cerotto non irritante. In caso di sostanze liquide o di alcune paste può essere necessario applicare la sostanza sulla garza e successivamente applicare questa sulla pelle. Per tutto il periodo dell'esposizione, la garza dovrebbe essere mantenuta blandamente a contatto della pelle da un'apposita fascia semiocclusiva. Tuttavia, in alcuni casi può essere utilizzata una fascia occlusiva. Bisognerebbe impedire l'accesso dell'animale alla garza e la risultante ingestione/inalazione della sostanza in esame.

La durata dell'esposizione è di 4 ore. Se si sospetta che la sostanza possa produrre una severa reazione cutanea, (ad esempio, corrosiva) la durata dell'esposizione dovrebbe essere ridotta (ad esempio, ad un'ora o 3 minuti). Quando si utilizzi un periodo di esposizione inferiore a 4 ore e quando si osservi una rilevante reazione cutanea non è necessario ripetere la prova utilizzando un periodo di esposizione di 4 ore. In determinate condizioni, ad esempio, in funzione di previste utilizzazioni ed esposizioni umane, può essere opportuno prolungare l'esposizione. Alla fine del periodo di esposizione, quando possibile, la sostanza residua dovrebbe essere rimossa, usando acqua o un appropriato solvente, senza alterare la reazione presente o l'integrità dell'epidermide.

1.6.3.1. Osservazione e valutazione

Dopo la rimozione della garza, gli animali dovrebbero essere osservati per eventuali manifestazioni eritematose ed edematose e i risultati registrati secondo l'apposita scala rispettivamente dopo 30—60 minuti, e quindi a 24, 48, 72 ore. L'irritazione cutanea è valutata e registrata in conformità della scala di cui alla tabella in appendice.

Per la determinazione della reversibilità, possono risultare necessarie altre osservazioni. In aggiunta alle osservazioni relative all'irritazione, si dovrebbe procedere alla descrizione dettagliata di qualsiasi tipo di lesione grave come la corrosione (distruzione irreversibile del tessuto cutaneo) e di qualsiasi altro effetto tossico.

2. **DATI**

I risultati dovrebbero essere riassunti in forma tabulare indicante per ogni singolo animale il grado di irritazione per l'eritema e l'edema durante tutto il periodo di osservazione. Si dovrebbe procedere anche alla registrazione di qualsiasi lesione grave, alla descrizione del grado e del tipo di irritazione, della reversibilità o corrosività e di qualsiasi altro effetto tossico osservato.

3. RELAZIONE

3.1. **Relazione sul saggio**

La relazione sul saggio dovrà, se possibile, comprendere le seguenti informazioni:

— specie, ceppo, origine degli animali usati, condizioni ambientali, dieta, ecc.,

— condizioni sperimentali (incluse le pertinenti proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica e la tecnica utilizzata per la preparazione e la pulizia della pelle),

— per ciascun animale e per ogni periodo di osservazione il tabulato dei dati delle risposte relative all'irritazione (ad esempio 1, 24, 48 e 72 ore, ecc., dopo l'eliminazione della garza),

— descrizione di qualsiasi lesione grave osservata, inclusa la corrosività,

— descrizione narrativa del grado e del tipo di irritazione osservata e di qualsiasi effetto istopatologico,

— descrizione di qualsiasi effetto tossico diverso dall'irritazione cutanea,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione e interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

Appendice

TABELLA: VALUTAZIONE DELLA REAZIONE CUTANEA

Eritema e formazione di escara

	Valutazione
Nessun eritema	0
Eritema molto leggero (appena percettibile)	1
Eritema ben definito	2
Eritema da leggero a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) a leggera formazione di escara (danni in profondità)	4

Formazione di edema

Nessun edema	0
Edema molto leggero (appena percettibile)	1
Edema leggero (bordi della superficie cutanea ben definiti dal gonfiore)	2
Edema moderato (bordi sollevati di circa un mm)	3
Edema forte (sollevato più di un mm e che si estende oltre la superficie dell'esposizione)	4

B. 5. TOSSICITÀ ACUTA

IRRITAZIONE DEGLI OCCHI

1. METODO

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principio del metodo di saggio**

La sostanza da saggiare viene applicata in dose unica su un solo occhio di ognuno di alcuni animali da esperimento; l'occhio non trattato serve da controllo. Il grado di irritazione è valutato secondo una opportuna scala a determinati intervalli e ulteriormente descritto per fornire una completa valutazione degli effetti. La durata delle osservazioni dovrebbe essere sufficiente per valutare completamente la reversibilità o l'irreversibilità degli effetti osservati.

1.5. **Criteri di qualità**

Nessuno.

1.6. **Descrizione del metodo di saggio**

1.6.1. *Preparazioni*

Durante le 24 ore precedenti l'inizio dell'esperimento, si dovrebbero esaminare entrambi gli occhi degli animali provvisoriamente selezionati per il saggio. Gli animali che presentano irritazioni agli occhi, difetti oculari o lesioni preesistenti alla cornea non dovrebbero essere utilizzati. Le sostanze fortemente alcaline o acide e le sostanze che hanno già dimostrato una definita corrosività durante lo studio di irritazione cutanea o in altre prove non devono necessariamente essere analizzate per l'irritazione oculare.

1.6.2. *Condizioni per il saggio*

1.6.2.1. Animali per l'esperimento

Sebbene siano stati utilizzati vari animali, si raccomanda di effettuare il saggio con conigli albini adulti e sani.

1.6.2.2. Numero di animali

Almeno 3 animali dovrebbero essere utilizzati. Ulteriori animali possono essere richiesti per chiarificare risposte equivoche.

1.6.2.3. Livelli di dosaggio

Per saggiare le sostanze liquide si impiega una dose di 0,1 ml. Per le sostanze solide, le paste e le sostanze particellate, la quantità utilizzata dovrebbe avere il volume di 0,1 ml o il peso approssimativo di 0,1 g (il peso deve sempre essere registrato). Se la sostanza in esame è solida o granulare, dovrebbe essere ridotta in polvere fine. Il volume delle particelle dovrebbe essere misurato dopo averle leggermente costipate, ad esempio battendo leggermente il contenitore usato per la misurazione.

1.6.2.4. Periodo di osservazione

La durata del periodo di osservazione non dovrebbe essere fissata rigidamente. Essa dovrebbe essere sufficiente per valutare la reversibilità o l'irreversibilità degli effetti osservati, ma normalmente non superare i 21 giorni dall'instillazione.

1.6.3. *Procedimento*

Ogni gabbia dovrebbe contenere un solo animale. La sostanza da saggiare dovrebbe essere applicata nella tasca congiuntivale a fondo cieco di un occhio di ciascun animale, dopo aver leggermente distaccato la palpebra inferiore dal bulbo oculare. Per evitare la fuoriuscita del materiale, le palpebre devono essere tenute delicatamente chiuse per circa un secondo. L'occhio non trattato serve da controllo.

Per 24 ore dopo l'instillazione della sostanza in esame, gli occhi degli animali non dovrebbero essere lavati. Se appropriato, dopo 24 ore si può effettuare un lavaggio.

Per le sostanze che risultano essere irritanti a questa prova, si può determinare l'utilità dell'irrigazione dell'occhio quale mezzo per ridurre gli effetti irritanti o altri effetti dannosi. In questi casi si raccomanda l'utilizzazione di 6 conigli. Quattro secondi dopo l'instillazione della sostanza in esame, si lavano gli occhi di 3 conigli e 30 secondi dopo l'instillazione si lavano gli occhi degli altri 3 conigli. Per entrambi i gruppi, gli occhi vanno lavati per 5 minuti utilizzando un volume e un flusso tali da non causare lesioni.

1.6.3.1. Osservazioni e valutazione

Gli occhi dovrebbero essere esaminati dopo 1, 24, 48 e 72 ore. Se dopo 72 ore non si nota irritazione, lo studio può essere interrotto.

In caso di complicazioni persistenti alla cornea o di altre irritazioni oculari, può risultare necessario proseguire l'osservazione per determinare l'evoluzione delle lesioni e la loro reversibilità o irreversibilità. Oltre all'esame della cornea, dell'iride e della congiuntiva, si dovrebbero registrare e includere nella relazione ogni altra eventuale lesione. Per ogni esame si dovrebbe registrare il livello di reazione oculare (vedi tabella in appendice) (la valutazione delle reazioni oculari è soggetta a varie interpretazioni. Per assistere il laboratorio di saggio e coloro che fanno ed interpretano le osservazioni, una guida illustrata dell'irritazione oculare può essere usata).

L'utilizzazione di una lente binoculare, di una lampada a fessura, di un biomicroscopio o di un altro ausilio idoneo, può facilitare l'esame delle reazioni. Dopo la registrazione delle osservazioni effettuate dopo 24 ore, gli occhi di una parte o di tutti i conigli possono ancora essere esaminati con l'ausilio della fluoresceina.

2. DATI

I risultati dovrebbero essere riassunti in un tabulato indicante per ogni animale la valutazione dell'irritazione ai tempi di osservazione prescritti. Una descrizione del grado e del tipo di irritazione, la presenza di lesioni gravi e qualsiasi effetto rilevato, diverso dagli effetti oculari, dovranno essere riportati.

3. RELAZIONE

3.1. **Relazione sul saggio**

La relazione sull'esperimento dovrà, se possibile, contenere le seguenti informazioni:

— informazioni relative agli animali (specie, ceppo, origine degli animali, condizioni ambientali, dieta, ecc.),

— condizioni dell'esperimento (comprese le pertinenti caratteristiche fisico-chimiche della sostanza in esame),

— tabulato degli effetti irritanti/corrosivi per ogni singolo animale ad ogni tempo a cui viene effettuata l'osservazione (ad esempio 1, 24, 48 e 72 ore),

— descrizione di ogni lesione grave rilevata,

— descrizione narrativa del grado e del tipo di irritazione o corrosione osservata, compresa la reversibilità,

— descrizione del metodo adottato per classificare l'irritazione a 1, 24, 48 e 72 ore (ad esempio lampada manuale a fessura, biomicroscopio, fluoresceina),

— descrizione di qualsiasi effetto topico non oculare riscontrato,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione e interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

Appendice

TABELLA: CLASSIFICAZIONE DELLE LESIONI OCULARI

Cornea

Opacità: grado di densità (per la lettura viene scelta la superficie più densa)

Nessuna ulcerazione od opacità	0
Zone sporadiche o diffuse di opacità (diverse dall'opacità leggera della luminosità normale), particolari dell'iride nettamente visibili	1
Zona traslucente chiaramente visibile, particolari dell'iride leggermente oscurati	2
Zona madreperlacea, nessun particolare dell'iride non visibile, dimensione della pupilla appena distinguibile	3
Cornea opaca, iride non distinguibile attraverso l'opacità	4

Iride

Normale	0
Rughe notevolmente aperte, congestione, gonfiore, iperemia circumcorneale modesta, oppure iniezione, l'uno o l'altro di questi effetti o una combinazione di alcuni degli stessi, l'iride reagisce ancora alla luce (una reazione lenta è positiva)	1
Nessuna reazione alla luce, emorragia, lesioni macroscopiche (uno qualsiasi o tutti questi effetti)	2

Congiuntiva

Rossore (della congiuntiva palpebrale e bulbare, della cornea e dell'iride)

Vasi sanguigni normali	0
Alcuni vasi sanguigni decisamente iperemici (congestionati)	1
Colore cremisi diffuso, i singoli vasi sanguigni non sono facilmente distinguibili	2
Rosso bovino diffuso	3

Chemosi: palpebre e/o membrane nittitanti

Nessun gonfiore	0
Qualsiasi gonfiore superiore alla norma (incluse le membrane nittitanti)	1
Gonfiore evidente con parziale ectropion	2
Gonfiore con palpebre socchiuse (circa per la metà)	3
Gonfiore con palpebre quasi chiuse (più della metà)	4

B. 6. TOSSICITA ACUTA

SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA

1. METODO

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principio del metodo di saggio / «Guinea Pig Maximization Test»**

A seguito di esposizioni iniziali alla sostanza in esame (periodo di «induzione», gli animali dopo due settimane dall'ultima esposizione di induzione, sono sottoposti ad una «esposizione di provocazione» (challenge exposure) alla sostanza in esame, al fine di determinare se uno stato di ipersensibilizzazione sia stato indotto. La sensibilizzazione è valutata tramite l'esame della reazione cutanea all'esposizione di provocazione.

1.5. **Criteri di qualità**

Nessuno.

1.6. **Descrizione del metodo di saggio**

1.6.1. *Preparazione*

Gli animali sani e giovani (meno di un anno di età) sono scelti con metodo casuale e assegnati al gruppo da trattare e al gruppo di controllo. Prima del saggio, si effettua il taglio o la rasatura del pelo nella zona della spalla. Bisognerebbe porre attenzione a non scorticare la pelle dell'animale

1.6.2. *Condizioni del saggio*

1.6.2.1. Animali per l'esperimento

Si utilizzano porcellini d'India albini.

1.6.2.2. Numero e sesso

Si possono utilizzare animali di sesso maschile e/o femminile. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Si utilizzano 20 animali per il gruppo da trattare e almeno 10 per il gruppo di controllo. L'uso di un numero inferiore di animali deve essere giustificato.

1.6.2.3. Livelli di dosaggio

La concentrazione della sostanza in esame viene regolata in base al livello più alto che può ben essere tollerato in ogni fase dell'induzione.

La concentrazione relativa alla provocazione non dovrebbe causare evidenza di irritazione cutanea in animali non sensibilizzati. Queste concentrazioni possono essere determinate tramite uno studio pilota su un numero esiguo di animali (2-3 animali).

1.6.2.4. Periodo di osservazione

Durante il periodo di induzione, le osservazioni sono effettuate allo scopo di rilevare eventuali effetti di irritazione. Dopo l'esposizione di provocazione, le reazioni cutanee sono registrate a 48 e 72 ore.

1.6.3. *Procedimento*

Gli animali sono pesati prima dell'inizio e al termine del saggio. Si procede alla rimozione del pelo nella zona della spalla. Il procedimento comprende due fasi:

1.6.3.1. Induzione

Giorno 0 — gruppo trattato

Nella zona della spalla si effettuano le seguenti coppie di iniezioni intradermiche, in modo tale da avere ogni coppia di iniezioni su ciascun lato della linea mediana:

1. 0,1 ml di adiuvante completo di Freund (FCA),
2. 0,1 ml di sostanza in esame, utilizzando, se del caso, un veicolo,
3. 0,1 ml di sostanza in esame in FCA.

Le iniezioni 1 e 2 sono praticate molto vicine l'una all'altra e il più vicino possibile alla testa, mentre la 3 è praticata verso la parte caudale della zona in esame.

Giorno 0 — gruppo di controllo

Le seguenti coppie di iniezioni intradermiche vengono praticate nelle stesse zone di cui sopra:

1. 0,1 ml di FCA,
2. 0,1 ml di solo veicolo,
3. 0,1 ml di veicolo in FCA.

Giorno 7 — gruppo trattato

Si procede nuovamente alla rimozione del pelo dalla zona da trattare. La sostanza in esame, diluita in un veicolo adatto (le sostanze liquide, se del caso, possono essere applicate direttamente), viene spalmata su una carta da filtro e applicata sulla zona da trattare e mantenuta a contatto per 48 ore per mezzo di una fasciatura adeguata.

Giorno 7 — gruppo di controllo

Si procede nuovamente alla rimozione del pelo dalla zona da trattare. Il veicolo è applicato nella suindicata zona da trattare e mantenuto a contatto per 48 ore tramite una fasciatura adeguata.

1.6.3.2. Esposizione di provocazione

Giorno 21

Si procede alla rimozione del pelo dai fianchi degli animali trattati e di controllo. Sul fianco sinistro degli animali trattati si applica una garza o una camera contenente la sostanza in esame, mentre sul fianco destro si applica una garza o camera con il solo veicolo.

Le bende sono mantenute per 24 ore a contatto con la pelle per mezzo di una fasciatura adeguata. Il gruppo di controllo viene esposto in modo analogo.

Giorni 23 e 24

21 ore dopo aver tolto la garza, la zona sottoposta ad esposizione di provocazione viene pulita e, se necessario, rasata.

3 ore più tardi (48 ore dall'inizio dell'esposizione di provocazione) si esamina e si registra la reazione cutanea.

24 ore dopo questa osservazione si effettua e si registra un secondo esame (72 ore).

Per chiarire i risultati ottenuti con la prima esposizione di provocazione, circa una settimana dopo si dovrebbe, se necessario, ripetere la prova con un nuovo gruppo di controllo del veicolo.

1.6.3.3. Osservazione e valutazione

Tutte le reazioni cutanee e qualsiasi risultato insolito derivante dalle esposizioni induttiva e di provocazione dovrebbero essere registrati e inclusi nella relazione.

2. DATI

I risultati dovrebbero essere riassunti in forma tabulare indicante per ogni animale le reazioni cutanee rilevate nel corso di ogni osservazione.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

La relazione sul saggio dovrà, se possibile, contenere i seguenti dati:

- ceppo di porcellino d'India usato,
- condizioni sperimentali,
- numero, età e sesso degli animali,
- peso di ogni singola cavia all'inizio e al termine dell'esperimento,
- ciascuna osservazione effettuata su ogni singolo animale, compreso il sistema di classificazione degli effetti, qualora usato,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione e interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

Osservazioni

Il «Guinea Pig Maximization Test» (GPMT) è un saggio di tipo adiuvante molto diffuso. Sebbene per svelare la capacità di una sostanza di provocare una reazione cutanea di sensibilizzazione si possono usare diversi altri metodi, elencati in appendice, il GPMT è considerato il metodo (di riferimento) preferito.

La sua sensibilità e la sua capacità di rivelare la sostanze potenzialmente sensibilizzanti per la cute umana sono ritenute importanti per un sistema di classificazione della tossicità pertinente alla sanità pubblica. La scelta di una qualsiasi prova alternativa deve essere fatta seguendo criteri che ne garantiscano la validità. Tra questi criteri si trova la reazione ad allergeni standard, come il 2,4-dinitroclorobenzene o la p-fenilendiammina o ad altro agente a forte capacità sensibilizzante appropriato alla classe di sostanze da saggiare.

Non vi è singolo metodo di saggio che consentirà l'identificazione adeguata di tutte le sostanze dotate di un potenziale di sensibilizzazione per la cute umana, né appropriato per tutte le sostanze.

Per la scelta di un metodo di saggio devono essere presi in considerazione fattori quali le caratteristiche fisiche della sostanza, compresa la sua capacità di penetrare la cute, e il suo modo di venire a contatto con l'uomo. I saggi che utilizzano i porcellini d'India possono essere suddivisi in prove di tipo adiuvante, nelle quali qualsiasi stato allergico viene rafforzato sciogliendo o sospendendo la sostanza in esame nell'adiuvante completo di Freund (FCA), e in prove di tipo non adiuvante. In taluni casi vi possono essere buone ragioni per scegliere una prova che comporti l'applicazione locale piuttosto che l'iniezione intradermica impiegata nel Guinea Pig Maximization Test. Anche in questo caso, i criteri da prendere in considerazione comprenderanno le caratteristiche fisiche della sostanza da esaminare e le condizioni relative alla probabile esposizione umana. Indipendentemente dal metodo usato, la sensibilità del ceppo di porcellini d'India utilizzato per la prova di sensibilizzazione cutanea deve essere controllata ad intervalli regolari (6 mesi) utilizzando noti agenti sensibilizzanti forte e moderati e ottenendo un numero adeguato di risposte positive.

Appendice

Prova	Draize	Adiuvante completo di Freund	Ottimizzazione Mauer	Buehler	Prova epicutanea aperta	Adiuvante frazionato
Specie	porcellino d'India	porcellino d'India	porcellino d'India	porcellino d'India	porcellino d'India	porcellino d'India
Via	intradermica (id)	intradermica (id)	intradermica (id)	epicutanea (ec)	epicutanea (ec)	id ed ec
Numero nel gruppo di prova	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
Numero di gruppi di prova	1	1	1	1	fino a 6	1
Numero nel gruppo di controllo	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
Esposizione induttiva, via	id	id	id	dermica	dermica	id e dermica
Numero di esposizioni	10	5	9	3	20 o 21	4
Periodo di esposizione	—	—	24 ore	6 ore ciascuno	continuo	48 ore ognuno
Tipo di benda	—	—	—	chiusa	aperta	chiusa
Gruppo(i) di prova	TS (¹)	TS in FCA	TS in FCA	TS	TS	TS
Gruppo di controllo	—	solo FCA	—	—	solo veicolo (v)	—
Sito	fianco sinistro	fianco destro	posteriore	fianco sinistro	fianco destro	spalla
Frequenza	ogni secondo giorno	ogni secondo giorno	ogni secondo giorno	ogni 7 giorni	giornaliera	0, 2, 4, 7 g
Durata	0—18 giorni	0—8 giorni	0—21 giorni	0—14 giorni	0—20 giorni	0—7 giorni
Concentrazione	2—10 due volte quella della prima	invariabile per la durata dell'esperimento	0,1 ml allo 0,1 %	invariabile per la durata dell'esperimento	uguale per gruppo, diversa tra i gruppi	invariabile per la durata dell'esperimento
Esposizione di provocazione						
(Challenge exposure), via	id	dermica	id	dermica	dermica	dermica
Numero di esposizioni	1	2	2	1	2	1
Giorni	35	22 e 35	14 e 28	28	21 e 35	20
Periodo di esposizione	—	—	24 ore	6 ore	—	24 ore
Tipo di benda		aperta	—	chiusa	aperta	chiusa
Gruppo(i) di prova	TS	TS	TS	TS	TS	TS
Gruppo di controllo	TS	TS	TS	TS	TS	TS
Sito	fianco destro	fianco sinistro	posteriore, in un punto diverso	fianco destro	fianco sinistro	spalla
Concentrazione	come la prima	4 diverse	0,1 ml allo 0,1 %	come per l'esposizione induttiva	4 diverse	metà dell'esposizione induttiva
Valutazione (ore dopo l'esposizione di provocazione)	24, 48	24, 48, 72	24	24, 48	24, 48 e/o 72	24, 48

(¹) TS = Sostanza in esame.

B. 7. TOSSICITA SUBACUTA PER VIA ORALE

1. METODO

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. **Sostanza di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principio del metodo di saggio**

La sostanza in esame è somministrata per via orale in dosi giornaliere a alcuni gruppi di animali da esperimento, una dose per gruppo, per un periodo di 28 giorni. Durante la somministrazione gli animali vengono osservati ogni giorno per la rilevazione di eventuali segni di tossicità. Gli animali deceduti durante l'esperimento vanno sottoposti a necroscopia. Al termine del saggio gli animali sopravvissuti vengono sottoposti a necroscopia.

1.5. **Criteri di qualità**

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

1.6.1. *Preparazioni*

Per un periodo di almeno 5 giorni prima della prova, gli animali sono mantenuti nelle condizioni di stabulazione e di alimentazione del saggio. Prima del saggio, animali giovani e sani sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi sperimentali. Le sostanze in esame possono essere somministrate con la dieta, a mezzo di tubo gastrico, in capsule, oppure nell'acqua da bere. Per tutta la durata dell'esperimento, la sostanza in esame dovrebbe essere somministrata a tutti gli animali seguendo lo stesso metodo. Se per facilitare il dosaggio si utilizza un veicolo o altri additivi, dovrebbe essere noto che questi non producono effetti tossici. Ove appropriato, è possibile avvalersi di dati storici.

1.6.2. *Condizioni per il saggio*

1.6.2.1. Animali per l'esperimento

Salvo controindicazioni, il ratto è la specie d'elezione. Si dovrebbero utilizzare ceppi di laboratorio di animali giovani e sani comunemente usati e la somministrazione della sostanza in esame dovrebbe iniziare da un punto di vista ottimale prima che i ratti raggiungano l'età di 6 settimane, e comunque prima che abbiano superato le 8 settimane d'età. All'inizio del saggio, l'intervallo della variazione ponderale degli animali utilizzati non dovrebbe superare più o meno il 20 % del valore medio pertinente.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ciascun livello di dosaggio dovrebbero essere utilizzati almeno 10 animali (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile). Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Nei casi in cui siano programmati sacrifici intermedi di alcuni animali, il numero degli animali dovrebbe essere aumentato per includere quello degli animali da sacrificare prima del termine della prova. Inoltre, un gruppo satellite di 10 animali (5 per sesso) può essere sottoposto ad un trattamento di 28 giorni con il livello massimo di dosaggio e tenuto sotto osservazione per valutare, durante 14 giorni dopo il trattamento, la reversibilità, la persistenza oppure l'insorgenza ritardata di effetti tossici.

1.6.2.3. Livelli di dosaggio

Almeno 3 livelli di dose e un gruppo di controllo dovrebbero essere usati. Quest'ultimo, fatta eccezione per la somministrazione della sostanza in esame, sarà trattato in modo identico ai gruppi trattati. Allorquando per facilitare il dosaggio si utilizza un veicolo, quest'ultimo dovrebbe essere somministrato agli animali del gruppo di controllo con le stesse modalità dei gruppi trattati e utilizzando la quantità massima di veicolo somministrata a qualsiasi gruppo trattato. Il livello di dosaggio della sostanza in esame più alto dovrebbe produrre effetti tossici senza causare alcun decesso o almeno causandone molto pochi. Il livello di dose più basso non dovrebbe causare alcuna evidenza di tossicità. Nei casi in cui sia possibile stimare l'esposizione umana prevista, il livello di dosaggio più basso dovrebbe superare questo livello di esposizione. Dal punto di vista ottimale, la dose intermedia dovrebbe causare effetti tossici osservabili minimi. Nel caso in cui siano utilizzati più dosaggi intermedi, i loro livelli dovrebbero essere intervallati in modo da produrre una graduazione di effetti tossici.

Nei gruppi a livello di dosaggio basso e medio e in quello di controllo, l'incidenza dei decessi dovrebbe essere bassa per consentire una valutazione significativa dei risultati.

Se la sostanza in esame è somministrata con la dieta, si può utilizzare sia una concentrazione dietetica costante (ppm o mg/kg di alimento), sia un livello di dosaggio costante in funzione del peso degli animali; l'alternativa prescelta deve essere specificata.

Se la sostanza è somministrata tramite tubo gastrico, la dose dovrebbe essere somministrata ogni giorno alla stessa ora e i livelli di dosaggio dovrebbero essere modificati ad intervalli regolari (settimanalmente o bisettimanalmente), al fine di mantenere un livello di dosaggio costante in funzione del peso corporeo dell'animale.

1.6.2.4. Saggio limite

Qualora il saggio della durata di 28 giorni, effettuato in conformità del metodo qui di seguito dettagliato, con un livello di dosaggio di 1 000 mg/kg peso corporeo/giorno, oppure con un livello di dosaggio superiore in relazione all'eventuale esposizione umana, ove nota, non causi evidenza di effetti tossici, ulteriori saggi possono essere considerati non necessari. Per le sostanze a bassa tossicità somministrate con la dieta, è importante assicurarsi che la loro quantità e le altre caratteristiche della sostanza in esame non interferiscano con le normali necessità nutrizionali degli animali di saggio.

1.6.2.5. Periodo di osservazione

Tutti gli animali dovrebbero essere esaminati quotidianamente e tutti i segni di tossicità vanno registrati, compresi il momento della loro insorgenza, il loro grado e la loro durata. Dovrebbero, inoltre, essere registrati il momento del decesso e il momento in cui i segni di tossicità appaiono e scompaiono.

1.6.3. *Procedimento*

La sostanza in esame va somministrata per un periodo di 28 giorni, dal punto di vista ottimale, per 7 giorni alla settimana. Gli animali in qualsiasi gruppo satellite previsto per proseguire le osservazioni dovrebbero essere osservati per altri 14 giorni, senza alcun trattamento al fine di rilevare la scomparsa o la persistenza degli effetti tossici.

Le osservazioni dovrebbero comprendere le alterazioni intervenute nella pelle e nel pelo, negli occhi e nelle membrane mucose, e anche nei sistemi respiratorio, circolatorio, nervoso autonomo e centrale, nell'attività somatomotoria e nel comportamento dell'animale. Ogni settimana si dovrebbe misurare il consumo di alimento (e il consumo d'acqua, qualora la sostanza in esame sia somministrata nell'acqua da bere) e il peso degli animali. L'esame regolare degli animali è necessario per impedire, per quanto

possibile, la perdita di animali dello studio dovuta a cause come cannibalismo, autolisi dei tessuti, oppure a errata collocazione. Al termine della prova tutti gli animali sopravvissuti nei gruppi trattati, ad eccezione del gruppo satellite, vengono sottoposti a necroscopia. Gli animali moribondi dovrebbero essere allontanati e sottoposti a necroscopia al momento in cui sono notati.

Al termine del saggio tutti gli animali, compresi quelli di controllo, saranno sottoposti ai seguenti esami:

1. ematologia, comprendente almeno l'ematocrito, la concentrazione di emoglobina, la conta degli eritrociti, il numero totale e differenziale dei leucociti e una misura del potenziale di coagulazione;

2. biochimica-clinica del sangue, comprendente almeno un parametro della funzionalità epatica e renale: alanina aminotransferasi nel siero (prima conosciuta come glutamico-piruvico transaminasi nel siero), aspartato aminotransferasi nel siero (prima conosciuta come glutamico-ossalacetico transaminasi nel siero), azoto come urea, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine seriche totali.

Altre determinazioni, che possono risultare necessarie per un'adeguata valutazione tossicologica, comprendono il calcio, il fosforo, il cloruro, il sodio, il potassio, il glucosio a digiuno, l'analisi dei lipidi, gli ormoni, l'equilibrio acido/base, la metaemoglobina, l'attività colinesterasica.

Per estendere l'indagine degli effetti osservati, se necessario, si possono utilizzare ulteriori esami biochimico-clinici.

1.6.3.1. Necroscopia macroscopica

Tutti gli animali del saggio dovrebbero essere sottoposti a necroscopia macroscopica completa. Per evitare la disidratazione, il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli dovrebbero essere pesati umidi al più presto possibile dopo la dissezione. Gli organi e i tessuti (fegato, reni, milza, ghiandole surrenali, cuore e qualsiasi altro organo che presenti lesioni macroscopische o variazioni delle dimensioni) dovrebbero essere conservati in un mezzo adatto per un eventuale futuro esame istopatologico.

1.6.3.2. Eame istopatologico

Gli organi e i tessuti degli animali del gruppo ad alto dosaggio e del gruppo di controllo opportunamente preservati dovrebbero essere sottoposti ad esame istologico. Gli organi e i tessuti che presentano difetti attribuibili alla sostanza in esame somministrata al dosaggio più elevato dovrebbero essere esaminati anche per i gruppi a dosaggio inferiore. Gli animali dell'eventuale gruppo satellite dovrebbero essere sottoposti ad esame istologico, in particolare per gli organi e i tessuti che risultano colpiti da effetti tossici negli altri gruppi trattati.

2. **DATI**

I risultati dovrebbero essere riassunti in una tabella indicante per ogni gruppo trattato il numero di animali all'inizio del saggio, e il numero di animali che mostra ciascun tipo di lesione.

Tutti i risultati osservati dovrebbero essere valutati con un adeguato metodo statistico. Può essere utilizzato qualsiasi metodo statistico riconosciuto.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

La relazione sul saggio dovrà, se possibile, contenere le seguenti informazioni:

— specie, ceppo, origine degli animali, condizioni ambientali, dieta, ecc.,

— condizioni del saggio,·

— livelli di dosaggio (con eventuale veicolo, se usato) e concentrazioni,

— dati relativi alle risposte tossiche per sesso e livello di dosaggio,

— livello senza effetti, ove possibile,

— momento in cui è intervenuto il decesso durante il saggio o se gli animali sono sopravvissuti sino al termine,

— effetti tossici o altri effetti,

— momento in cui è stato rilevato ogni segno anormale e suo decorso,

— dati relativi al consumo di alimenti e al peso corporeo,

— esami biochimico-clinici effettuati e tutti i relativi risultati,

— esami ematologici effettuati e tutti i relativi risultati,

— risultati della necroscopia,

— descrizione dettagliata di tutti i risultati istopatologici,

— elaborazione statistica dei risultati, ove appropriato,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione e interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

———

B. 8. TOSSICITA SUBACUTA PER INALAZIONE

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. Sostanza di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

Diversi gruppi di animali da esperimento sono esposti quotidianamente per un periodo determinato a concentrazioni graduate della sostanza in esame; si utilizza una sola concentrazione per gruppo, somministrata per 28 giorni. Se si fa uso di un veicolo per ottenere una concentrazione appropriata della sostanza in esame nell'atmosfera, si dovrebbe prevedere anche un gruppo di animali di controllo trattati con il veicolo. Durante il periodo di trattamento, gli animali vengono esaminati quotidianamente per rilevare i segni della tossicità. Gli animali che muoiono durante il saggio e quelli che sopravvivono sono sottoposti a necroscopia alla fine del saggio.

1.5. Criteri di qualità

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

1.6.1. *Preparazioni*

Per almeno 5 giorni prima dell'esperimento gli animali sono mantenuti nelle condizioni di stabulazione e di alimentazione dell'esperimento. Prima del saggio, gli animali giovani e sani sono scelti con metodo casuale e assegnati ai vari gruppi previsti. Se necessario, alla sostanza in esame può essere aggiunto un veicolo idoneo per facilitare la generazione di una concentrazione appropriata della sostanza in esame nell'atmosfera. Se per facilitare il dosaggio si utilizza un veicolo o altri additivi, questi dovrebbero essere noti per non produrre effetti tossici. Se appropriato, possono essere utilizzati i dati storici.

1.6.2. *Condizioni per il saggio*

1.6.2.1. Animali per l'esperimento

Salvo controindicazioni, il ratto è la specie d'elezione. Si dovrebbero utilizzare ceppi di laboratorio di animali giovani e sani comunemente usati. All'inizio del saggio, l'intervallo della variazione ponderale degli animali utilizzati non dovrebbe superare più o meno il 20 % del valore medio pertinente.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ogni gruppo in esame dovrebbero essere utilizzati almeno 10 animali (5 di sesso maschile e 5 di sesso femminile). Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Ove siano programmati sacrifici intermedi, i numeri degli animali dovrebbero essere aumentati per includere quello degli animali da

sacrificare prima del termine della prova. Inoltre, un gruppo satellite di 10 animali (5 animali per sesso) può essere sottoposto al trattamento con il livello superiore di dosaggio per 28 giorni ed esaminato, nei seguenti 14 giorni, per quanto riguarda la reversibilità o la persistenza o l'insorgenza ritardata degli effetti tossici.

1.6.2.3. Concentrazioni per l'esposizione

Sono richieste almeno tre concentrazioni con un controllo, oppure, se viene utilizzato un veicolo, un controllo del veicolo (corrispondente alla massima concentrazione del veicolo). Gli animali del gruppo di controllo dovrebbero essere trattati in modo identico agli animali dei gruppi trattati, ad eccezione del trattamento con la sostanza in esame. La massima concentrazione dovrebbe produrre effetti tossici, ma senza causare alcun decesso, o almeno causandone molto pochi. La concentrazione più bassa non dovrebbe causare alcuna evidenza di tossicità. Nei casi in cui sia possibile stimare l'esposizione umana prevista, il livello di dosaggio più basso dovrebbe superare questo livello. Dal punto di vista ottimale la concentrazione intermedia dovrebbe produrre effetti tossici minimi. Nel caso in cui siano utilizzate più concentrazioni intermedie, queste dovrebbero essere intervallate in modo tale da produrre una graduazione di effetti tossici. Nei gruppi esposti alle concentrazioni bassa e intermedia e nei controlli, l'incidenza dei decessi dovrebbe essere bassa al fine di consentire una valutazione significativa dei risultati.

1.6.2.4. Tempo di esposizione

La durata dell'esposizione giornaliera dovrebbe essere di 6 ore. Tuttavia, per esigenze specifiche, si possono utilizzare esposizioni di diversa durata.

1.6.2.5. Dispositivi

Gli animali dovrebbero essere sottoposti all'esperimento in dispositivi per l'inalazione appositamente progettati per consentire un flusso dinamico dell'aria di almeno 12 ricambi l'ora per garantire un adeguato contenuto di ossigeno e un'atmosfera uniformemente distribuita. Qualora sia usata una camera, essa dovrebbe essere progettata in modo da minimizzare l'affollamento degli animali da esperimento e al tempo stesso rendere massima l'esposizione mediante inalazione alla sostanza in esame. Come regola generale per garantire la stabilità dell'atmosfera della camera, il «volume» complessivo degli animali di saggio non dovrebbe superare il 5 % di quello della camera di saggio. Si può ricorrere ad una esposizione oro-nasale, della sola testa, oppure di tutto il corpo in camera individuale; le prime due modalità d'esposizione renderanno minima l'assunzione delle sostanze attraverso altre vie.

1.6.2.6. Periodo di osservazione

Durante l'intero trattamento e il periodo di recupero, gli animali dovrebbero essere esaminati quotidianamente per rilevare i segni di tossicità. Il momento del decesso e il momento in cui si manifestano e scompaiono i sintomi di tossicità dovrebbero essere registrati.

1.6.3. *Procedimento*

Gli animali vengono esposti giornalmente alla sostanza in esame per 5—7 giorni alla settimana per un periodo di 28 giorni. Gli animali di ogni gruppo satellite, previsto per proseguire le osservazioni, dovrebbero essere tenuti per altri 14 giorni, senza alcun trattamento, al fine di rilevare la scomparsa oppure la persistenza degli effetti tossici. L'esperimento dovrebbe essere effettuato a una temperatura di 22 °C ± 3 °C. Dal punto di vista ottimale, l'umidità relativa dovrebbe essere mantenuta tra il 30 e il 70 % ma, in taluni casi (ad esempio, prove di aerosol), ciò può non essere realizzabile. Durante l'esposizione, la somministrazione di cibo e acqua dovrebbe essere sospesa.

Dovrebbe essere utilizzato un sistema dinamico d'inalazione con un adeguato sistema analitico di controllo della concentrazione. Si raccomanda di effettuare un esperimento di prova per stabilire le

concentrazioni idonee di esposizione. La velocità di flusso dell'aria dovrebbe essere regolata in modo da rendere uniformi le condizioni nella camera di esposizione. Il sistema dovrebbe consentire di raggiungere al più presto possibile le condizioni d'esposizione stabili.

Dovrebbero essere misurati o controllati:

a) la velocità del flusso d'aria (continuamente);

b) la concentrazione effettiva della sostanza in esame nella zona di respirazione. Durante il periodo di esposizione, la concentrazione non dovrebbe variare oltre il ± 15 % del valore medio. Tuttavia, nel caso di polveri o aerosol, questo livello di controllo potrebbe non essere realizzabile, per cui un più ampio intervallo dovrebbe, quindi, essere accettabile. Durante tutta la sperimentazione, le concentrazioni dovrebbero essere mantenute per quanto possibile costanti da un giorno all'altro. Per particelle in sospensione e aerosol, allo scopo di valutare la costanza della distribuzione della prondezza delle particelle, tale distribuzione dovrebbe essere misurata con la necessaria frequenza;

c) temperatura e umidità;

d) durante e dopo l'esposizione si procede all'effettuazione e alla registrazione sistematica delle osservazioni; registri individuali dovrebbero essere mantenuti per ciascun animale. Tutti gli animali dovrebbero essere giornalmente esaminati e i segni di tossicità, compresi il momento del loro insorgere, il loro grado e la loro durata, dovrebbero essere registrati. Le osservazioni effettuate dovrebbero comprendere le alterazioni della pelle e del pelo, degli occhi, delle membrane mucose e dei sistemi respiratorio, circolatorio, nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento dell'animale. La misura del peso degli animali dovrebbe essere effettuata ogni settimana. Si raccomonda inoltre, che il consumo di alimento sia anche misurato ogni settimana. L'osservazione regolare degli animali è necessaria per minimizzare la perdita di animali da studiare causata da cannibalismo, autolisi dei tessuti o errata collocazione. Al termine dello studio, gli animali sopravvissuti, esclusi quelli del gruppo satellite, vengono sottoposti ad esame necroscopico. Gli animali moribondi dovrebbero essere allontanati e sottoposti a necroscopia.

Al termine del saggio tutti gli animali, compresi quelli di controllo, verranno sottoposti ai seguenti esami:

i) ematologia, comprendente almeno l'ematocrito, la concentrazione dell'emoglobina, la conta degli eritrociti, il numero totale e differenziale dei leucociti, e una misura del potenziale di coagulazione;

ii) determinazioni biochimico-cliniche nel sangue, comprendenti almeno un parametro della funzionalità epatica e renale: alanina aminotransferasi nel siero (prima conosciuta come glutamico-piruvico transaminasi nel siero), aspartato aminotransferasi nel siero (prima conosciuta come glutamico-ossalacetico transaminasi nel siero), azoto come urea, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine seriche totali. Altre determinazioni che possono risultare necessarie per una adeguata valutazione tossicologica, comprendono il calcio, il fosforo, il cloruro, il sodio, il potassio, il glucosio a digiuno, l'analisi dei lipidi, gli ormoni, l'equilibrio acido/base, la metamoglobina, l'attività colinesterasi. Ove necessario, si possono effettuare altre analisi/biochimiche cliniche per estendere l'indagine degli effetti osservati.

1.6.3.1. Necroscopia macroscopica

Tutti gli animali del saggio dovrebbero essere sottoposti a necroscopia macroscopica completa. Per evitare la disidratazione, il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli dovrebbero essere pesati umidi al più presto possibile dopo la dissezione. Gli organi e i tessuti (il tratto respiratorio, fegato, reni, milza, ghiandole surrenali, cuore e qualsiasi altro organo che presenti lesioni macroscopiche o variazioni nelle dimensioni) dovrebbero essere conservati in un mezzo adatto per l'eventuale futuro esame istopatologico.

La rinofaringe e i polmoni dovrebbero essere asportati intatti, pesati e trattati con un fissatore idoneo a garantire la conservazione della struttura dei polmoni. La perfusione con un fissatore è considerata una procedura efficace.

1.6.3.2. Esame istopatologico

Gli organi e i tessuti degli animali del gruppo trattato con la concentrazione più elevata e del gruppo di controllo dovrebbero essere sottoposti ad esame istologico. Gli organi e i tessuti che presentano difetti attribuibili alla sostanza in esame, somministrata al più alto livello di dosaggio, dovrebbero essere esaminati in tutti i gruppi trattati con i dosaggi inferiori. Gli animali di ogni gruppo satellite dovrebbero essere sottoposti ad esame istologico, in particolare per gli organi e i tessuti che risultano colpiti da effetti tossici negli altri gruppi trattati.

2. DATI

I risultati dovrebbero essere riassunti sotto forma tabulare indicante, per ogni gruppo trattato, il numero di animali all'inzio del saggio e il numero di animali che presentano ciascun tipo di lesione.

Tutti i risultati osservati dovrebbero essere valutati secondo un adeguato metodo statistico. Può essere utilizzato qualsiasi metodo statistico riconosciuto.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

La relazione sul saggio dovrà, se possibile, contenere le seguenti informazioni:

— specie, ceppo, origine degli animali, condizioni ambientali, dieta, ecc.;

— condizioni del saggio:

Descrizione dell'apparecchiatura utilizzata, comprendente la progettazione, il tipo, le dimensioni, la provenienza dell'aria, il sistema per la formazione di particelle e aerosol, il metodo per il condizionamento dell'aria, il trattamento dell'aria di scarico e il metodo adottato per l'alloggiamento degli animali in una camera di prova, qualora se ne faccia uso. Dovrebbe essere fornita una descrizione degli strumenti utilizzati per rilevare la temperatura, l'umidità e, quando del caso, la stabilità delle concentrazioni di aerosol o la granulometria delle particelle.

Dati relativi all'esposizione:

Essi dovrebbero essere tabulati e presentati con valori medi e con una misura della variabilità (ad esempio deviazione standard) e dovrebbero includere:

a) velocità del flusso d'aria attraverso l'apparecchiatura di inalazione,

b) temperatura e umidità dell'aria,

c) concentrazioni nominali (quantitativo globale della sostanza in esame introdotta nel dispositivo di inalazione diviso per il volume dell'aria),

d) tipo di veicolo, se usato,

e) concentrazioni effettive nella zona di respirazione,

f) dimensioni mediane delle particelle (ove appropriato);

— dati relativi alla risposta tossica per sesso e concentrazione;

— momento del decesso durante il saggio o se gli animali sono sopravvissuti sino al suo termine;

— descrizione di effetti tossici o altri effetti; livello senza effetti;

— momento in cui è stato rilevato ciascun segno abnorme e suo decorso;

— dati relativi al consumo di alimento e al peso corporeo;

— analisi ematologiche effettuate e loro risultati;

— analisi biochimiche-cliniche effettuate e loro risultati;

— risultati della necroscopia;

— descrizione dettagliata di tutti i risultati istopatologici;

— elaborazione statistica dei risultati, ove possibile;

— discussione dei risultati;

— interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione e interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. **BIBLIOGRAFIA**

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

B. 9. TOSSICITA SUBACUTA CUTANEA

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. Sostanza di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

La sostanza in esame è applicata ogni giorno sulla pelle di alcuni gruppi di animali da esperimento, in dosi graduate, una dose per gruppo, per un periodo di 28 giorni. Durante il periodo di applicazione, gli animali vengono osservati quotidianamente per rilevare i segni di tossicità. Si sottopogono a necroscopia gli animali morti durante la prova e al termine del saggio vengono sottoposti a necroscopia gli animali sopravvissuti.

1.5. Criteri di qualità

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

1.6.1. *Preparazioni*

Per un periodo di almeno 5 giorni prima della prova gli animali sono mantenuti nelle condizioni di stabulazione e di alimentazione del saggio. Prima del saggio animali giovani e sani sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi previsti per il trattamento e per il controllo. Poco prima dell'esperimento si effettua il taglio del pelo nella parte dorsale del corpo degli animali. Si può procedere alla rasatuta, ma essa dovrebbe essere effettuata circa 24 ore prima dell'esperimento. Di norma è necessario ripetere il taglio o la rasatura a intervalli di circa una settimana. Durante il taglio o la rasatura si dovrà badare a non scorticare la pelle dell'animale. Per l'applicazione della sostanza in esame, si dovrebbe preparare almeno il 10 % della superficie corporea. Nel determinare l'entità dell'area da preparare e le dimensioni della copertura sarebbe opportuno tenere presente il peso dell'animale. Le sostanze solide, che possono essere ridotte in polvere se appropriato, dovrebbero essere inumidite sufficientemente con acqua o, se necessario, con un veicolo adatto ad assicurare un buon contatto con la pelle. In generale le sostanze liquide sono saggiate in forma non diluita. Dal punto di vista ottimale, applicazioni quotidiane vengono effettuate sulla base di 5-7 giorni per settimana.

1.6.2. *Condizioni per il saggio*

1.6.2.1. Animali per l'esperimento

Possono essere utilizzati ratti adulti, conigli o porcellini d'India. Si possono utilizzare altre specie animali, ma il loro uso dovrebbe essere giustificato. All'inizio del saggio l'intervallo di variazione di peso degli animali non dovrebbe superare più o meno il 20 % del valore medio pertinente.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ciascun livello di dosaggio dovrebbero essere utilizzati almeno 10 animali (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile) con pelle sana. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Qualora siano stati programmati sacrifici intermedi di alcuni animali, il numero degli animali dovrebbe essere aumentato per includere quello degli animali da sacrificare prima del termine della prova. Inoltre, un altro gruppo (gruppo satellite) di 10 animali (5 animali per sesso) può essere sottoposto al trattamento con il livello massimo di dosaggio per 28 giorni e tenuto in osservazione per 14 giorni dopo il trattamento per rilevare la reversibilità, la persistenza o l'insorgenza ritardata degli effetti tossici.

1.6.2.3. Livelli di dosaggio

Sono richiesti almeno 3 livelli di dosaggio, almeno 6 ore al giorno con un gruppo di controllo oppure, nel caso venga usato un veicolo, con un gruppo di controllo del veicolo. L'applicazione della sostanza in esame dovrebbe essere effettuata ogni giorno alla stessa ora e modificata ad intervalli (settimanali e bisettimanali) al fine di mantenere un livello di dosaggio costante in funzione del peso dell'animale. Gli animali del gruppo di controllo dovrebbero essere trattati in modo identico agli animali del saggio, ad eccezione che per l'applicazione delle sostanze da saggiare.

Se, per facilitare il dosaggio, viene utilizzato un veicolo, al gruppo di controllo dovrebbe essere somministrato il veicolo allo stesso modo che ai gruppi trattati e nella stessa quantità somministrata al gruppo con il dosaggio più elevato. Il livello di dosaggio della sostanza in esame più elevato dovrebbe causare effetti tossici ma senza causare alcun decesso, oppure causandone in numero molto limitato. Il livello di dosaggio più bassso non dovrebbe provocare alcuna evidenza di tossicità. Nei casi in cui vi sia una utile stima dell'esposizione umana, il livello di dosaggio più basso dovrebbe superarla. Dal punto di vista ottimale, il livello intermedio dovrebbe provocare effetti tossici osservabili minimi. Nei casi in cui siano usati più livelli di dosaggio intermedi, essi dovrebbero essere intervallati al fine di causare una graduazione di effetti tossici. Nei gruppi a livello di dosaggio basso e medio e di controllo, l'incidenza dei decessi dovrebbe essere bassa per consentire una valutazione significativa dei risultati.

Se l'applicazione della sostanza in esame dovesse causare una grave irritazione della pelle, sarebbe opportuno ridurne le concentrazioni, e ciò può causare una diminuzione oppure l'assenza degli altri effetti tossici al livello di dosaggio più elevato. Inoltre, se la pelle è stata gravemente danneggiata, può essere necessario interrompere il saggio e iniziarne uno nuovo a concentrazioni più basse.

1.6.2.4. Saggio limite

Qualora un saggio preliminare, effettuato con un livello di dosaggio di 1 000 mg/kg di peso corporeo, oppure con una dose superiore in relazione all'eventuale esposizione umana, se nota, non causi effetti tossici, ulteriori saggi possono essere considerati non necessari.

1.6.2.5. Periodo di osservazione

Gli animali da esperimento dovrebbero essere esaminati quotidianamente al fine di rilevare i segni della tossicita. Il momento del decesso e quello in cui appaiono e scompaiono i segni di tossicità dovrebbero essere registrati.

1.6.3. *Procedimento*

Ogni gabbia dovrebbe contenere un solo animale. Da un punto di vista ottimale, la sostanza in esame viene applicata agli animali 7 giorni la settimana per un periodo di 28 giorni. Gli animali di ogni eventuale gruppo satellite previsto per proseguire le osservazioni dovrebberd essere tenuti per altri 14 giorni, senza subire trattamenti, al fine di rilevare l'eventuale guarigione o la persistenza degli effetti tossici. La durata dell'esposizione dovrebbe essere almeno di 6 ore/giorno. La sostanza in esame dovrebbe essere applicata uniformemente su di un'area pari a circa il 10% della superficie corporea totale. Per le sostanze altamente tossiche, la superficie coperta può essere inferiore, ma la maggior parte dell'area trattata dovrebbe essere ricoperta da uno strato per quanto possibile sottile e uniforme. Durante il periodo di esposizione, la sostanza in esame viene tenuta a contatto della pelle mediante una garza porosa e un cerotto non irritante. La parte su cui viene applicata la sostanza dovrebbe essere ulteriormente coperta in modo opportuno per tenere ferma la garza e la sostanza in esame e affinché gli

animali non possano ingerire la sostanza stessa. Dispositivi per la limitazione dei movimenti possono essere utilizzati per impedire agli animali di ingerire la sostanza in esame, ma non è consigliabile l'immobilizzazione completa dell'animale.

Alla fine del periodo di esposizione, la sostanza residua dovrebbe essere rimossa utilizzando acqua, se possibile, o altri prodotti idonei per la pulizia della pelle.

Tutti gli animali dovrebbero essere esaminati quotidianamente e dovrebbero essere registrati i segni di tossicità, inclusi il momento dell'insorgenza, il loro grado e durata.

Le osservazioni dovrebbero includere le alterazioni della pelle e del pelo, degli occhi e delle membrane mucose, e anche dei sistemi respiratorio, circolatorio, nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento dell'animale. La misura del peso degli animali dovrebbe essere effettuata ogni settimana. Si raccomanda, inoltre, che il consumo di alimento sia anche misurato ogni settimana. L'esame periodico degli animali è necessario per impedire la perdita degli animali dello studio, dovuta a cause come cannibalismo, autolisi dei tessuti o errata collocazione. Al termine del saggio, tutti gli animali sopravvissuti, ad eccezione del gruppo satellite, sono sottoposti a necroscopia. Gli animali moribondi dovrebbero essere allontanati e sottoposti a necroscopia al momento in cui sono notati.

Al termine dell'esperimento tutti gli animali, compresi quelli di controllo, saranno sottoposti ai seguenti esami:

1. ematologia, comprendente almeno l'ématocrito, la concentrazione dell'emoglobina, la conta degli eritrociti, il numero totale e differenziale dei leucociti e una misura del potenziale di coagulazione;

2. biochimica-clinica del sangue, comprendente almeno un parametro della funzionalità epatica e renale: alanina aminotransferasi nel siero (prima conosciuta come glutamico-piruvico transaminasi nel siero), aspartato aminotransferasi nel siero (prima conosciuta come glutamico-ossalacetico transaminasi nel siero), azoto come urea, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine seriche totali.

Altre determinazioni che possono essere necessarie per una adeguata valutazione tossicologica comprendono il calcio, il fosforo, il cloruro, il sodio, il potassio, il glucosio a digiuno, l'analisi dei lipidi, gli ormoni, l'equilibrio acido/base, la metaemoglobina, l'attività colinesterasica.

Per estendere l'indagine degli effetti osservati, ove necessario, si potranno utilizzare ulteriori prove biochimico-cliniche.

1.6.4. *Necroscopia macroscopica*

Tutti gli animali del saggio dovrebbero essere sottoposti alla necroscopia macroscopica completa. Per evitare la disidratazione, il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli dovrebbero essere pesati al più presto possibile dopo la dissezione. Gli organi e i tessuti, ad esempio la pelle normale e trattata, il fegato, i reni e gli organi bersaglio (cioè gli organi che presentano lesioni macroscopiche o variazioni di dimensione), dovrebbero essere conservati in un mezzo adatto per l'eventuale futuro esame istopatologico.

1.6.5. *Esame istopatologico*

Gli organi e i tessuti degli animali del gruppo a livello di dosaggio più elevato e del gruppo di controllo, opportunamente preservati, dovrebbero essere sottoposti all'esame istopatologico. Gli organi e i tessuti che presentano difetti attribuibili alla sostanza in esame al dosaggio più elevato dovrebbero essere esaminati in tutti i gruppi a dosaggio inferiore. Gli animali dell'eventuale gruppo satellite dovrebbero essere sottoposti ad esame istologico, in particolare per gli organi e i tessuti che risultano colpiti dagli effetti tossici negli altri gruppi trattati.

2. DATI

I risultati dovrebbero essere riassunti in forma tabulare indicante per ogni gruppo trattato il numero di animali all'inizio del saggio e il numero di animali che presentano ciascun tipo di lesioni.

Tutti i risultati osservati, quantitativi e incidentali, devono essere valutati secondo un adeguato metodo statistico. Può essere utilizzato qualsiasi metodo statistico riconosciuto.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

La relazione sul saggio dovrà, se possibile, contenere le seguenti informazioni:

- dati sugli animali (specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.),
- condizioni del saggio,
- livelli di dosaggio (con eventuale veicolo, se utilizzato) e concentrazioni,
- livello senza effetti, dove possibile,
- risposte tossiche per sesso e dosaggio,
- momento del decesso durante il saggio o se gli animali sono sopravvissuti sino al termine,
- effetti tossici o altri effetti,
- momento dell'osservazione di ciascun segno anomalo e suo successivo decorso,
- dati relativi al consumo di alimenti e al peso corporeo,
- esami ematologici effettuati e loro risultati,
- esami biochimico-clinici effettuati e loro risultati,
- risultati della necroscopia,
- descrizione dettagliata di tutti i risultati istopatologici,
- elaborazione statistica dei risultati, ove possibile,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione e interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

B. 10. ALTRI EFFETTI — MUTAGENESI

MAMMIFERI: *IN VITRO* — TEST CITOGENETICO

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

Il test citogenetico *in vitro* è un test di mutagenesi a breve termine per la rivelazione di aberrazioni cromosomiche strutturali nelle cellule di mammifero in coltura. Possono essere utilizzate sia colture di linee cellulari stabilizzate che colture cellulari primarie. Dopo esposizione alle sostanze in esame con e senza miscela di attivazione di enzimi epatici (frazione post-mitocondriale addizionata di cofattori), le colture di cellule vengono trattate con un inibitore del fuso mitotico (ad esempio, colchicina) per accumulare le cellule in uno stadio simil-metafasico (c-metafase). Le cellule sono raccolte in tempi adeguati e vengono fatti i preparati cromosomici. I preparati vengono colorati e le cellule metafasiche analizzate per individuarne le anomalie cromosomiche.

1.5. Criteri di qualità

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

1.6.1. *Preparazioni*

Prima del trattamento delle cellule, le sostanze in esame vengono preparate in terreno di coltura o disciolte in solventi appropriati. Si usano linee cellulari stabilizzate o colture di cellule primarie, per esempio cellule di Hamster cinese e linfociti umani.

1.6.2. *Condizioni per il saggio*

Numero di colture:

Per ogni punto dell'esperimento si usano almeno due colture.

Uso di controlli negativi e positivi:

Come controlli negativi si impiegano solventi (quando il solvente non è costituito dal terreno di coltura o dall'acqua), miscela di attivazione di enzimi epatici, miscela di attivazione di enzimi epatici e solvente e controlli non trattati. Ogni esperimento comporta anche un controllo positivo; quando viene impiegata la miscela di attivazione d'enzimi epatici per attivare la sostanza in esame, si deve usare come controllo positivo un composto noto per richiedere attivazione metabolica.

Dosi:

Si usano almeno 3 dosi del composto in esame con almeno un intervallo d'un fattore logaritmico tra di esse; la dose più elevata riduce l'attività mitotica del 50 % circa.

Condizioni di coltura:

Vanno impiegati in modo appropriato il terreno di coltura, le condizioni d'incubazione (per esempio temperatura, recipienti di coltura, concentrazione di CO_2 e l'umidità).

1.6.3. *Procedimento*

1.6.3.1. Preparazione delle colture

Linee cellulari stabilizzate: le cellule sono generate da colture stock (per esempio mediante tripsinizzazione o «shaking-off»), seminate in recipienti di coltura in densità appropriate e messe in incubazione a 37 °C.

Linfociti umani: un quantitativo di sangue intero eparinizzato è aggiunto a un terreno di coltura contenente fitoemoagglutinina, siero fetale bovino e antibiotici e viene posto in incubazione a 37 °C.

1.6.3.2. Trattamento delle colture con il composto in esame

i) Trattamento senza miscela di attivazione di enzimi epatici

Tutti i trattamenti debbono coprire il periodo di un intero ciclo cellulare e gli schemi di fissazione garantiranno l'analisi delle prime mitosi che si presenteranno dopo il trattamento di cellule trattate a diversi stadi del ciclo. Quando il trattamento non copre la durata di un intero ciclo cellulare, si scelgono molteplici tempi di fissazione per il campionamento di cellule a stadi diversi del ciclo cellulare durante il trattamento, per esempio G_1, S e G_2. La sostanza in esame è aggiunta a colture di linee cellulari stabilizzate quando esse si trovano allo stadio di crescita esponenziale. Le colture di linfociti umani vengono trattate quando si trovano ancora in una condizione semisincrona. Se la sostanza in esame altera la durata del ciclo cellulare, l'intervallo di fissazione deve essere cambiato di conseguenza.

ii) Trattamento con miscela di attivazione di enzimi epatici

Per il trattamento, il composto in esame in combinazione con il sistema di attivazione dovrebbe essere presente il più a lungo possibile senza esercitare un effetto tossico sulle cellule. Se, per motivi di tossicità, questo trattamento non copre la durata di un intero ciclo cellulare, si scelgono molteplici tempi di fissazione per campionare cellule a diversi stadi del ciclo cellulare nel corso del trattamento, ossia G_1, S e G_2.

Raccolta delle cellule:

Le colture cellulari sono trattate con l'inibitore del fuso mitotico da una a 2 ore prima della raccolta. Ogni coltura è raccolta e trattata separatamente per la preparazione di cromosomi.

1.6.3.3. Preparazione di cromosomi

Le preparazioni di cromosomi comportano il trattamento ipotonico delle cellule, la fissazione, la stesura su vetrini e la colorazione.

Analisi:

Almeno 100 metafasi ben distribuite per coltura vengono analizzate per individuarne le aberrazioni cromosomiche. I vetrini ricevono, prima dell'analisi, un numero di codice. Nei linfociti umani si analizzano soltanto metafasi contenenti 46 centromeri. Nelle linee cellulari stabilizzate si analizzano solo metafasi contenenti un numero di centromeri pari al numero modale ± 2.

2. DATI

I dati sono presentati sotto forma di tabelle. Aberrazioni di tipo cromatico («gaps», rotture, interscambi), cromosomico («gaps», rotture, «minutes», anelli, dicentrici, policentrici) e il numero di metafasi aberranti (con e senza «gaps») vengono registrati separatamente per tutte le colture trattate e di controllo. I dati vengono valutati con metodi statistici appropriati.

3. PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

3.1. Relazione sul saggio

La relazione dovrebbe comprendere le seguenti informazioni:

— cellule utilizzate,

— condizioni nelle quali è stato effettuato il test: composizione del terreno, concentrazione di CO_2, temperature d'incubazione, dosi, tempo di trattamento, durata del trattamento con l'inibitore del fuso mitotico e loro concentrazione, tipo di miscela d'attivazione di enzimi epatici usata, controlli positivi e negativi,

— numero di colture cellulari,

— numero di metafasi analizzate (dati indicati separatamente per ogni coltura),

— indice mitotico,

— tipo e numero di aberrazioni indicato separatamente per ogni coltura trattata e di controllo, numero modale di cromosomi nelle linee cellulari stabilizzate usate,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

B. 11. ALTRI EFFETTI — MUTAGENESI

MAMMIFERI: MIDOLLO OSSEO — TEST CITOGENETICO, ANALISI CROMOSOMICHE

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. Sostanza di riferimento

Nessuna.

1.4. Principi del metodo di saggio

Questo test citogenetico *in vivo* è un test di mutagenesi a breve termine per l'individuazione di aberrazioni cromosomiche strutturali. Dette aberrazioni cromosomiche vengono generalmente valutate nelle prime mitosi successive al trattamento. Con i mutageni chimici la maggior parte delle aberrazioni provocate sono di tipo cromatidico. Il test utilizza cellule di midollo osseo di mammiferi esposti a sostanze chimiche attraverso adeguate vie di somministrazione e successivamente sacrificati ad intervalli sequenziali. Gli animali vengono ulteriormente trattati, prima del sacrificio, con inibitore del fuso, quale colchicina, per accumulare cellule ad uno stadio simil-metafasico della mitosi (c-metafase). A partire dalle cellule vengono ricavate preparazioni cromosomiche essiccate che vengono poi colorate; le metafasi vengono poi sottoposte ad analisi microscopica per individuare le aberrazioni cromosomiche.

1.5. Criteri di qualità

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

1.6.1. *Preparazioni*

Le sostanze chimiche in esame vengono disciolte in soluzione fisiologica. Qualora non siano solubili, vengono disciolte o messe in sospensione in solventi adatti.

Vengono utilizzate soluzioni fresche del composto in esame. Qualora venga utilizzato un solvente per facilitare il dosaggio, esso non deve interferire con il composto, né produrre effetti tossici.

1.6.2. *Condizioni per il saggio*

1.6.2.1. Animali sperimentali

Vengono utilizzati roditori quali ratti, topi o Hamster cinesi. Vengono scelti a caso soggetti giovani adulti, che vengono poi assegnati ai gruppi di trattamento e di controllo.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ogni gruppo trattato e di controllo vengono utilizzati almeno 5 soggetti maschi e 5 femmine. Pertanto, per ogni tempo, dovrebbero essere sacrificati 10 animali per gruppo, se nel piano sperimentale sono previsti più tempi di prelievo dopo il trattamento.

1.6.2.3. Via di somministrazione

In genere le sostanze in esame dovrebbero essere somministrate un'unica volta. Il trattamento può essere ripetuto a intervalli regolari sulla base di dati tossicologici. Tuttavia lo schema di trattamento ripetuto può essere applicato soltanto se la sostanza in esame non ha effetti citotossici sul midollo osseo. La somministrazione avviene in genere per via orale o mediante iniezione intraperitoneale. Altre vie di somministrazione possono anche essere usate.

1.6.2.4. Controlli positivi e negativi

Come controllo positivo viene utilizzata una sostanza di cui è nota la capacità di produrre aberrazioni cromosomiche *in vivo*; inoltre un gruppo di controllo negativo (solvente) deve anche essere incluso nel piano di ogni esperimento.

1.6.2.5. Dosi

Per il «dossier» di base viene utilizzata una dose della sostanza in esame, che consiste nella dose massima tollerata o in quella che produce qualche indicazione di citotossicità come, ad esempio, la parziale inibizione della mitosi.

Possono essere utilizzate dosi addizionali qualora siano indicate da motivazioni scientifiche.

Qualora il test sia usato come prova di verifica dovrebbero essere utilizzate almeno altre due dosi.

1.6.3. *Procedimento*

Il test può essere eseguito in due modi:

i) gli animali vengono trattati con la sostanza in esame alla dose massima tollerata un'unica volta. Dopo il trattamento vengono prelevati campioni in tre tempi successivi. Il secondo prelievo viene effettuato dopo un intervallo di 24 ore. Poiché la cinetica del ciclo cellulare può essere influenzata dalla sostanza chimica utilizzata, il primo e il terzo prelievo vengono effettuati ad intervalli adeguatamente distanziati, in un periodo di tempo che va dalle 6 alle 48 ore.

   Qualora vengano usati dosaggi addizionali sarebbe opportuno prelevare campioni ad intervalli particolarmente sensibili, ovvero, qualora questo non sia noto, 24 ore dopo il trattamento;

ii) qualora, basandosi su dati farmacocinetici e metabolici, venga effettuato un trattamento con dosi ripetute ad intervalli regolari, i campioni dovrebbero essere prelevati 6 ore e 24 ore dopo l'ultimo trattamento.

Preparazione del midollo osseo:

Prima di venire sacrificati gli animali vengono sottoposti all'iniezione per via intraperitoneale di un'adeguata dose di inibitore del fuso mitotico in modo da ottenere un adeguato numero di cellule in c-metafase. Si ottengono campioni di midollo osseo da ambedue i femori di animali appena sacrificati, dopo applicazione di una soluzione isotonica. Dopo un adeguato trattamento ipotonico le cellule vengono fissate e quindi strisciate su vetrini. Dopo l'essiccazione si procede alla colorazione.

Analisi:

Prima dell'analisi microscopica, ai vetrini viene attribuito un numero di codice. Per l'individuazione delle aberrazioni cromosomiche strutturali vengono analizzati, per ciascun animale, almeno 50 metafasi ben distribuite con il numero completo dei centromeri. In aggiunta, l'indice mitotico più essere determinato per ciascun animale.

2. **DATI**

I dati sono presentati sotto forma di tabelle. Le aberrazioni di tipo cromatidico e isocromatidico («gaps», rotture, interscambi), e il numero di metafasi aberranti (con o senza «gaps») e gli indici mitotici, ove determinati, vengono registrati separatamente per tutti gli animali trattati e per quelli di controllo. Vengono inoltre registrate per ogni gruppo trattato e di controllo le medie e le deviazioni standard. I dati vengono valutati con metodi statistici appropriati.

3. **PRESENTAZIONE DEI RISULTATI**

3.1. **Relazione sul saggio**

La relazione dovrebbe comprendere le seguenti informazioni:

— specie, razza ed età degli animali utilizzati,

— numero di animali di ciascun sesso nei gruppi trattati e di controllo,

— condizioni del test: descrizione dettagliata dello schema del trattamento e del prelievo di campioni, dosi, durata del trattamento con colchicina o colcemid e relativa concentrazione,

— numero di metafasi analizzate per ciascun animale,

— indici mitotici, ove determinati,

— tipo e numero di aberrazioni indicate separatamente per ogni animale trattato e per ogni animale di controllo,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. **Valutazione ed interpretazione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. **BIBLIOGRAFIA**

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

———

B. 12. ALTRI EFFETTI — MUTAGENESI

TEST DEL MICRONUCLEO

1. METODO

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principio del metodo di saggio**

Il test basato sul micronucleo è un test *in vivo*, a breve termine, effettuato su mammiferi,.per individuare lesioni a livello cromosomico o dell'apparato mitotico ad opera di sostanze chimiche. Questo test si basa sulla constatazione di un aumento dei micronuclei negli eritrociti policromatici degli animali sottoposti al trattamento rispetto a quelli osservati negli animali di controllo. I micronuclei sono formati da frammenti di cromosomi o da cromosòmi interi rimasti nella mitosi. Quando gli eritroblasti si trasformano in eritrociti, il nucleo principale viene espulso, ma il micronucleo può rimanere nel citoplasma. Per questo test vengono usati eritrociti policromatici giovani del midollo osseo di animali opportunamente esposti alle sostanze in esame attraverso vie di somministrazione adatte. Il midollo osseo viene prelevato e vengono effettuati strisci successivamente colorati. Gli eritrociti policromatici vengono esaminati al microscopio per individuare i micronuclei e viene stabilita la proporzione fra eritrociti policromatici e normocromatici.

1.5. **Criteri di qualità**

Nessuno.

1.6. **Descrizione del metodo di saggio**

1.6.1. *Preparazioni*

Le sostanze chimiche vengono disciolte in soluzione fisiologica. Qualora non siano solubili, vengono disciolte o messe in sospensione in solventi adatti. Qualora venga utilizzato un solvente per facilitare il dosaggio, esso non deve interferire con il composto né produrre effetti tossici. Normalmente, vengono impiegate soluzioni fresche del composto in esame.

1.6.2. *Condizioni per il saggio*

1.6.2.1. Animali sperimentali

Si raccomanda l'utilizzazione di topi, ma è possibile usare altri mammiferi. Vengono scelti a caso soggetti giovani adulti destinati ai gruppi di trattamento e ai gruppi di controllo.

1.6.2.2. Numero e sesso

Per ogni gruppo trattato e gruppo di controllo vengono utilizzati almenno 5 soggetti maschi e

5 femmine. Pertanto per ogni tempo di prelievo, dovrebbero essere sacrificati 10 animali per gruppo, se nel piano sperimentale sono previsti più tempi di prelievo.

1.6.2.3. Via di somministrazione

In genere le sostanze in esame dovrebbero essere somministrate un'unica volta. Il trattamento può essere ripetuto a intervalli regolari, sulla base di dati tossicologici. Tuttavia lo schema di trattamento ripetuto può essere applicato soltanto se la sostanza in esame non ha un effetto citotossico sul midollo osseo. La somministrazione avviene in genere per via orale o mediante iniezione intraperitoneale. Possono anche essere usate altre vie di somministrazione.

1.6.2.4. Controlli positivi e negativi

Per ogni esperimento vengono effettuati controlli positivi e negativi (solvente).

1.6.2.5. Dosi

Per il dossier di base viene utilizzata una dose della sostanza in esame che consiste nella dose massima tollerata o in quella che produce qualche indicazione di citotossicità come ad esempio un cambiamento del rapporto fra eritrociti policromatici e normocromatici.

Possono essere utilizzate dosi addizionali qualora siano indicate da motivi scientifici.

Qualora il test sia usato come saggio di verifica dovrebbero essere utilizzate almeno altre due dosi.

1.6.3. *Procedimento*

Il test può essere eseguito in due modi:

i) Gli animali vengono trattati con la sostanza in esame alla dose massima tollerata un'unica volta. I tempi di prelievo dovrebbero coincidere con la risposta massima, che varia a seconda della sostanza in esame. Pertanto, con la dose massima, vengono prelevati campioni di midollo osseo almeno tre volte, iniziando non prima di 12 ore dopo il trattamento, con successivi opportuni intervalli, senza superare le 72 ore.

   Qualora vengano usate dosi addizionali sarebbe opportuno prelevare campioni nel periodo di massima sensibilità, ovvero, qualora questo non sia noto, 24 ore dopo il trattamento.

ii) Qualora, basandosi su dati farmacocinetici e metabolici, venga effettuato un trattamento con dosi ripetute ad intervalli regolari, i campioni dovrebbero essere prelevati almeno 3 volte, iniziando non prima di 12 ore dopo l'ultimo trattamento e con successivi opportuni intervalli senza però superare le 72 ore.

Preparazione del midollo osseo:

Si ottengono campioni di midollo osseo da ambedue i femori di animali appena sacrificati e si sospendono in siero fetale di vitello. Le cellule vengono sedimentate mediante centrifugazione ed il sovranatante viene scartato. Gocce della sospensione omogenea vengono disposte su vetrini e strisciate. Dopo l'essiccazione si procede alla colorazione.

Analisi:

Prima dell'analisi microscopica ai vetrini viene attribuito un numero di codice. Vengono osservati almeno 1 000 eritrociti policromatici per animale, per l'incidenza dei micronuclei.

Il rapporto fra eritrociti policromatici e normocromatici viene determinato per ciascun animale contando un totale di 1 000 eritrociti.

2. DATI

I dati sono presentati sotto forma di tabelle. Il numero di eritrociti policromatici osservati, il numero di eritrociti che presentano micronuclei e la percentuale delle cellule con micronuclei vengono elencati separatamente per ogni animale trattato e per ogni animale di controllo, come pure il rapporto fra eritrociti policromatici e normocromatici. Vengono inoltre elencate, per ogni gruppo di sperimentazione e di controllo, le medie e le deviazioni standard. I dati vengono valutati con metodi statistici appropriati.

3. PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

3.1. Relazione sul saggio

La relazione dovrebbe comprendere le seguenti informazioni:

— specie, razza ed età degli animali utilizzati,

— numero di animali di ciascun sesso nei gruppi trattati e di controllo,

— condizioni del test: descrizione dettagliata dello schema del trattamento e del prelievo di campioni, dosi, dati relativi alla tossicità, controlli negativi e positivi,

— criteri adottati per il conteggio dei micronuclei,

— rapporto dose/effetto, ove possibile,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

B. 13. ALTRI EFFETTI — MUTAGENESI

BATTERI — *ESCERICHIA COLI* — REVERSIONE DELLA MUTAZIONE

1. METODO

1.1. **Introduzione**

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. **Definizioni**

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. **Sostanze di riferimento**

Nessuna.

1.4. **Principio del metodo di saggio**

Il sistema di reversione del triptofano *(trp)* in *Escherichia coli* è un test microbiologico che misura la reversione $trp^- \rightarrow trp^+$ indotta da sostanze chimiche che causano mutazioni del tipo «sostituzione di base» nel genoma del microorganismo.

I batteri sono esposti alla sostanza chimica in esame con e senza attivazione metabolica. Dopo un adeguato periodo d'incubazione in terreno minimo, le colonie revertanti vengono contate e confrontate con il numero di revertanti spontanei presenti in una coltura di controllo non trattata e/o trattata con solvente.

1.5. **Criteri di qualità**

Nessuno.

1.6. **Descrizione del saggio**

Per l'analisi possono esesre utilizzati i seguenti metodi: 1) il metodo di preincubazione; 2) il metodo di incorporazione diretta, in cui i batteri e la sostanza saggiata sono mescolati in uno strato di agar molle e versati sulla superficie di una piastra di terreno selettivo agarizzato.

1.6.1. *Preparazioni*

1.6.1.1. Batteri

I batteri vengono coltivati a 37 °C fin quasi al termine della fase di crescita esponenziale o all'inizio della fase stazionaria. La densità approssimativa delle cellule dovrebbe essere di 10^8—10^9 cellule per ml.

1.6.1.2. Attivazione metabolica

I batteri dovrebbero essere esposti alla sostanza in esame in presenza e assenza di un'adeguata miscela di attivazione di enzimi di fegato di mammifero (frazione postmitocondriale addizionata di cofattori) preparati a partire da topi o ratti, trattati precedentemente con agenti che causano l'induzione di enzimi.

1.6.2. *Condizioni del saggio*

Si dovrebbero usare tre ceppi, WP2, WP2 uvr A e WP2 uvr A pKM 101. Si debbono usare metodi noti per la preparazione delle colture stock e per la conservazione. Debbono essere oggetto di controlli le richieste nutrizionali e l'identità genetica dei ceppi, la loro sensibilità alle radiazioni ultraviolette o alla mitomicina C e la resistenza all'ampicillina del ceppo WP2 uvr A pKM 101. I vari ceppi debbono anche produrre revertanti spontanei entro i valori limite attesi per ogni ceppo.

1.6.2.2. Terreni

Viene utilizzato un terreno adeguato per l'espressione e la selezione dei mutanti, con uno strato adeguato di agar.

1.6.2.3. Controlli negativi e positivi

Vanno eseguiti controlli concomitanti del non trattato e del solvente. I controlli positivi vanno eseguiti per due motivi:

i) Per confermare la sensibilità dei ceppi batterici.

Metilmetan sulfonato, 4-nitrochinolina ossido o etilnitrosourea possono essere utilizzati come controlli positivi per i test in assenza di attivazione metabolica.

ii) Per garantire l'attività di un adeguato sistema metabolico.

Un controllo positivo dell'attività di un sistema metabolico per tutti i ceppi consiste nell'utilizzazione di 2-aminoantracene. Possibilmente sarebbe opportuno effettuare un controllo positivo con una sostanza della stessa classe chimica di quella del composto in esame.

1.6.2.4. Quantità di sostanza in esame per piastra

Vengono effettuati esperimenti con almeno 5 dosi diverse, con intervalli semilogaritmici tra di loro. Le sostanze vengono saggiate fino al limite della solubilità o della tossicità. La tossicità risulta da una riduzione del numero di revertanti spontanei, da uno schiarimento del fondo di crescita ovvero dal grado di sopravvivenza delle colture trattate. Le sostanze non tossiche dovrebbero essere saggiate fino alla concentrazione di 5 mg per piastra prima di essere considerate negative.

1.6.2.5. Condizioni d'incubazione

Le piastre vengono poste in incubazione per un periodo variante da 48 a 72 ore a 37 °C.

1.6.3. *Procedimento*

Per il metodo di incorporazione diretta nella piastra, senza attivazione enzimatica, la sostanza in esame viene aggiunta a 0,1 ml di coltura fresca e a 2,0 ml di agar molle. Per quanto riguarda quello con attivazione metabolica, si aggiungono all'agar molle 0,5 ml di miscela di attivazione di enzimi epatici, contenente un'adeguata quantità di frazione postmitocondriale, dopo l'aggiunta della sostanza in esame e dei batteri. Il contenuto di ogni tubo viene agitato e versato sulla superficie di una piastra con terreno selettivo agarizzato. Si lascia solidificare l'agar e le piastre vengono messe in incubazione a 37 °C per un periodo che va dalle 48 alle 72 ore. Alla fine del periodo d'incubazione vengono contate le colonie revertanti per ciascuna piastra. Per quanto riguarda il metodo di preincubazione, una miscela della

sostanza saggiata, 0,1 ml di coltura batterica fresca e un'adeguata quantità di miscela di attivazione di enzimi epatici o la stessa quantità di miscela di attivazione di enzimi epatici o la stessa quantità di tampone viene preincubata prima di aggiungere 2,0 ml di agar molle. Tutte le altre fasi del procedimento sono uguali a quelle relative al metodo di incorporazione diretta. Per ambedue i metodi ogni piastramento viene fatto almeno in triplicato.

2. DATI

Il numero di colonie revertanti per ciascuna piastra viene riportato sia per la serie di controllo che per le serie trattate. Sia per la serie trattata che per quella di controllo si dovrebbe riportare il valore della conta di ogni singola piastra, il numero medio di colonie revertanti per piastra e le deviazioni standard. Tutti i risultati sono confermati mediante un esperimento indipendente. I dati dovrebbero essere valutati con adeguati metodi statistici.

3. PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

3.1. Relazione sul saggio

La relazione dovrebbe comprendere le seguenti informazioni:

- batteri, ceppi utilizzati,
- condizioni nelle quali è stato effettuato il test: dosi, tossicità, composizione dei terreni; procedure di esecuzione (preincubazione-incubazione); miscela di attivazione di enzimi epatici; sostanze di riferimento-controlli negativi,
- conteggio per ogni singola piastra, numero medio di colonie revertanti per piastra, deviazioni standard, rapporto dose/effetto, ove possibile,
- discussione dei risultati,
- interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

B. 14. ALTRI EFFETTI — MUTAGENESI

SALMONELLA TYPHIMURIUM — REVERSIONE DELLA MUTAZIONE

1. METODO

1.1. Introduzione

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. Definizioni

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. Sostanze di riferimento

Nessuna.

1.4. Principio del metodo di saggio

Il sistema di reversione dell'istidina *(his)* in *Salmonella typhimurium* è un test microbiologico che misura la reversione $his^- \rightarrow his^+$ indotta da sostanze chimiche che causano mutazioni di tipo «sostituzione di base» o mutazioni di tipo «inserzione-delezione» (frame-shift) nel genoma del microorganismo.

I batteri sono esposti alla sostanza chimica in esame con e senza attivazione metabolica e inoculati su piastre di terreno minimo. Dopo un adeguato periodo d'incubazione, le colonie revertanti vengono contate e confrontate con il numero di revertanti spontanei presenti in una coltura di controllo non trattata e/o trattata con un solvente.

1.5. Criteri di qualità

Nessuno.

1.6. Descrizione del metodo di saggio

1.6.1. *Preparazioni*

1.6.1.1. Batteri

Sono utilizzate colture batteriche fresche fatte crescere a 37 °C sin quasi al termine della fase di crescita esponenziale o all'inizio di quella stazionaria. La densità delle cellule dovrebbe essere di circa $10^8 - 10^9$ cellule per ml.

1.6.1.2. Attivazione metabolica

I batteri dovrebbero essere esposti alla sostanza in esame in presenza e assenza di una adeguata miscela di attivazione di enzimi di fegato di mammifero (frazione postmitocondriale addizionata di cofattori) preparati a partire da topi o ratti trattati precedentemente con agenti induttori di attività enzimatiche.

1.6.2. *Condizioni per il saggio*

1.6.2.1. Ceppi

Debbono essere usati almeno quattro ceppi: TA 1535, TA 1537, TA 98 e TA 100; possono inoltre essere usati anche altri ceppi, quali il TA 1538. Debbono inoltre essere usati metodi noti per la

preparazione di colture stock e per la conservazione. Debbono essere oggetto di controlli le richieste nutrizionali e l'identità genetica dei ceppi, nonché la loro sensibilità alle rediazioni ultraviolette e al cristalvioletto e la resistenza all'ampicillina. I vari ceppi debbono anche produrre revertanti spontanei entro i valori limite attesi per ogni ceppo.

1.6.2.2. Terreni

Viene usato un adeguato terreno selettivo con uno strato adeguato di agar molle sovrastante (Top agar).

1.6.2.3. Controlli positivi e negativi

Vanno effettuati controlli concomitanti del non trattato e del solvente.

I controlli positivi vanno eseguiti per due motivi:

i) Per confermare le sensibilità dei ceppi batterici.

I seguenti composti possono essere utilizzati per i test che non comportano attivazione metabolica:

Ceppo	*Reversione in presenza di*
TA 1535, TA 100	Sodio azide
TA 1538, TA 98	2-Nitrofluorene
TA 1537	9-Aminoacridina

ii) Per garantire l'attività di un adeguato sistema metabolico.

Un controllo positivo dell'attività di un sistema metabolico per tutti i ceppi consiste nell'utilizzazione di 2-aminoantracene.

Possibilmente sarebbe opportuno effettuare un controllo positivo con una sostanza della stessa classe chimica di quella del composto in esame.

1.6.2.4. Quantità di sostanza in esame per piastra

Vengono effettuati esperimenti con almeno 5 dosi diverse, con intervalli semilogaritmici fra di loro. Le sostanze vengono saggiate fino al limite della solubilità o della tossicità. La tossicità risulta da una riduzione del numero di revertanti spontanei, da uno schiarimento del fondo di crescita ovvero dal livello di sopravvivenza delle colture trattate. Le sostanze non tossiche dovrebbero essere saggiate fino alla concentrazione di 5 mg per piastra prima di essere considerate negative.

1.6.2.5. Condizioni d'incubazione

Le piastre vengono poste in incubazione per un periodo che va da 48 a 72 ore a 37 °C.

1.6.3. *Procedimento*

Per il metodo d'incorporazione diretta nella piastra, senza attivazione enzimatica, la sostanza in esame e 0,1 ml di coltura fresca sono aggiunti a 2,0 ml di agar molle. Per quanto riguarda il test con attivazione metabolica si aggiungono all'agar molle 0,5 ml di miscela di attivazione di enzimi epatici contenente una adeguata quantità di frazione postmitocondriale, dopo aver aggiunto la sostanza in esame e i batteri. Il contenuto di ogni tubo viene agitato e versato su una piastra con agar selettivo. Si lascia solidificare l'agar e le piastre vengono messe in incubazione a 37 °C per un periodo che va dalle 48 alle 72 ore. Alla fine del periodo d'incubazione vengono contate le colonie revertanti per ciascuna piastra.

Per quanto riguarda il metodo di preincubazione, una miscela della sostanza saggiata, 0,1 ml di coltura batterica fresca e una adeguata quantità di miscela di attivazione di enzimi epatici o la stessa quantità di tampone viene preincubata prima di aggiungere 2,0 ml di agar molle. Tutte le altre fasi sono uguali a quelle relative al metodo di incorporazione diretta.

Per ambedue i metodi è opportuno fare ogni piastramento almeno in triplicato.

2. DATI

Il numero di colonie revertanti per ciascuna piastra viene riportato sia per la serie di controllo che per le serie trattate. Il valore della conta di ogni singola piastra, il numero medio di colonie revertanti per piastra e le deviazioni standard dovrebbero essere presentate sia nel caso dei trattati che dei controlli. Tutti i risultati sono confermati mediante un esperimento indipendente. I dati dovrebbero essere valutati con adeguati metodi statistici.

3. PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

3.1. Relazione sul saggio

La relazione dovrebbe comprendere le seguenti informazioni:

— batteri, ceppi utilizzati,

— condizioni nelle quali è stato effettuato il test: dosi, tossicità, composizione dei terreni, procedure di esecuzione (preincubazione-incubazione); miscela di attivazione di enzimi epatici; sostanze di riferimento; controlli negativi,

— conteggio per singola piastra, numero medio di colonie revertanti per piastra, deviazioni standard, rapporto dose/effetto, ove possibile,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. Valutazione ed interpretazione

Vedi introduzione generale, parte B (punto C).

4. BIBLIOGRAFIA

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

———

PARTE C: METODI DI DETERMINAZIONE DELL'ECOTOSSICITÀ

C. 1. TOSSICITÀ ACUTA PER I PESCI

1. METODO

1.1. Introduzione

Per poter scegliere il metodo di saggio (statico, semistatico o a flusso continuo) più idoneo a garantire che le concentrazioni della sostanza in esame si mantengano soddisfacentemente costanti per tutta la durata del saggio, è desiderabile disporre, per quanto possibile, di dati concernenti la solubilità in acqua, la tensione di vapore, la stabilità chimica, le costanti di dissociazione e la biodegradabilità della sostanza in esame.

Sia per la programmazione del saggio che per l'interpretazione dei risultati dovrebbero essere presi in considerazione anche altri dati richiesti, ad esempio, la formula di struttura, il grado di purezza, la natura e la percentuale delle impurezze significative, la presenza e la quantità di additivi e il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua.

1.2. Definizione e unità

La tossicità acuta è l'effetto avverso discernibile indotto in un organismo entro un breve tempo (giorni) di esposizione ad una data sostanza. Nella presente prova, la tossicità acuta viene espressa come concentrazione letale mediana (CL_{50}), che è la concentrazione di una sostanza nell'acqua capace di uccidere il 50 % di un gruppo di pesci entro un periodo continuo di esposizione, la cui durata deve essere precisata. Tutte le concentrazioni delle sostanze in esame sono espresse in peso/volume (mg/l) nonché in peso/peso (parti per milione).

1.3. Sostanze di riferimento

Per dimostrare che, nelle condizioni sperimentali di laboratorio, la risposta della specie usata per il saggio non e variata in modo significativo, può essere saggiata una sostanza di riferimento. Per la presente prova non vengono specificate sostanze di riferimento.

1.4. Principio del metodo di saggio

I pesci sono esposti alla sostanza (alle sostanze) in esame, aggiunta all'acqua in varie concentrazioni, per un periodo non inferiore a 48 ore, ma uguale di preferenza a 96 ore. Le mortalità vengono registrate ad intervalli di almeno 24 ore e, quando possibile, per ciascun tempo di osservazione, si calcola la concentrazione (CL_{50}) alla quale muore il 50 % dei pesci.

1.5. Criteri di qualità

Alla fine della prova la mortalità fra gli animali di controllo non deve superare il 10 %.

La concentrazione di ossigeno deve essere rimasta superiore al 60 % del valore di saturazione dell'aria per tutta la durata della prova.

Vi dovrebbe essere evidenza sia dall'analisi o dalle proprietà chimiche o dal sistema di saggio impiegato che la concentrazione della sostanza in esame è stata adeguatamente mantenuta (ad esempio, entro l'80 % della concentrazione iniziale per tutta la durata della prova).

1.6. **Descrizione del metodo di saggio**

Tre diverse procedure possono essere usate.

Prova statica:

Prova di tossicità su organismi acquatici nel corso della quale non ha luogo alcun flusso della soluzione di saggio (le soluzioni non vengono cambiate per tutta la durata della prova).

Prova semistatica:

Prova senza alcun flusso della soluzione ma nella quale le soluzioni di saggio vengono regolarmente rinnovate in modo discontinuo e dopo periodi prolungati (ad esempio, 24 ore).

Prova a flusso continuo:

Prova di tossicità nella quale l'acqua è rinnovata costantemente nelle camere di saggio e il prodotto chimico in esame viene trasportato insieme all'acqua usata per rinnovare il mezzo del saggio.

1.6.1. *Reattivi*

1.6.1.1. Soluzioni delle sostanze da esaminare

Si preparano opportune soluzioni di riserva alla concentrazione richiesta, sciogliendo la sostanza in acqua deionizzata o comunque rispondente alle caratteristiche descritte al punto 1.6.1.2.

Le soluzioni di riserva delle sostanze scarsamente solubili in acqua possono essere preparate per dispersione ultrasonica o, se necessario, impiegando solventi organici, emulsionanti o disperdenti.

Qualora si impieghino tali sostanze ausiliari, i pesci del gruppo di controllo dovrebbero essere esposti a tali sostanze nella stessa concentrazione alla quale esse accompagnano la più elevata concentrazione della sostanza in esame. La concentrazione di tali sostanze ausiliari non dovrebbe superare 0,1 g/l.

Le soluzioni con le concentrazioni prescelte per il saggio vengono preparate diluendo la soluzione di riserva. Se si saggiano concentrazioni elevate, la sostanza può essere sciolta direttamente nell'acqua di diluizione.

La prova dovrebbe essere effettuata senza regolazione del pH. Se esiste evidenza di variazioni pronunciate del pH, si consiglia di ripetere la prova procedendo all'opportuna regolazione del pH e riportando i risultati. In questo caso, il valore del pH della soluzione di riserva dovrebbe essere regolato su quello dell'acqua di diluizione, a meno che non esistano specifiche ragioni per non fare ciò. A tal fine sono da preferirsi HCl ed NaOH. Questa regolazione del pH dovrebbe essere effettuata in modo che la concentrazione della sostanza in esame nella soluzione di riserva non cambi in modo significativo. Qualora la regolazione dovesse provocare reazioni chimiche o la precipitazione fisica del composto in esame, ciò dovrebbe essere riportato.

1.6.1.2. Acqua di mantenimento e di diluizione

Si possono impiegare acqua potabile (non contaminata da concentrazioni pericolose di cloro, metalli pesanti od altre sostanze), acqua naturale di buona qualità od acqua ricostituita (vedi appendice 1). Sono da preferirsi acque con una durezza totale compresa tra 50 e 250 mg/l (come $CaCO_3$) e con pH fra 6,0 e 8,5.

1.6.2. *Apparecchiatura*

Tutte le apparecchiature devono essere costruite in materiale chimicamente inerte:

- sistema di diluizione automatico (per le prove a flusso continuo),
- misuratore di ossigeno,
- apparecchiatura per la determinazione della durezza dell'acqua,
- apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura,
- pH-metro.

1.6.3. *Pesci per il saggio*

Possono essere impiegate una o più specie; la scelta è a discrezione del laboratorio che effettua la prova. Si suggerisce di scegliere le specie da impiegare sulla base di criteri pratici importanti, come agevole disponibilità per tutto l'anno, facilità di mantenimento, idoneità per il saggio, relativa sensibilità, e ogni fattore economico, biologico od ecologico che possa avere una rilevanza. I pesci dovrebbero essere in buona salute ed esenti da qualsiasi malformazione apparente. Le specie di pesci raccomandate per la prova sono indicate nell'appendice 2.

1.6.3.1. Mantenimento

I pesci dovrebbero provenire di preferenza da un singolo gruppo con lunghezza ed età simili. Essi devono essere mantenuti per almeno 12 giorni nelle seguenti condizioni:

— serbatoi:

si raccomandano almeno 300 l per i pesci di acqua fredda ed almeno 100 l per i pesci di acqua tiepida;

— carico:

appropriato al sistema (riciclo o a flusso continuo) e alla specie di pesce;

— acqua:

vedi punto 1.6.1.2;

— illuminazione:

fotoperiodo da 12 a 16 ore al giorno;

— concentrazione dell'ossigeno disciolto:

almeno l'80 % del valore di saturazione dell'aria;

— alimentazione:

tre volte alla settimana o quotidianamente con sospensione 24 ore prima dell'inizio della prova.

1.6.3.2. Mortalità

Dopo un periodo di adattamento di 48 ore, si procede a registrare la mortalità e si applicano i seguenti criteri:

— mortalità superiore al 10 % della popolazione in sette giorni: l'intera partita viene respinta;

— mortalità tra il 5 e il 10 % della popolazione: il periodo di adattamento prosegue per altri sette giorni. Se non si verificano ulteriori mortalità, la partita è accettabile, in caso contrario essa deve essere respinta;

— mortalità inferiore al 5 % della popolazione: la partita è accettabile.

1.6.4. *Adattamento*

Prima dell'impiego, tutti i pesci debbono essere posti per almeno sette giorni in acqua di qualità e temperatura da impiegare per il saggio.

1.6.5. *Procedura del saggio*

Al saggio definitivo si può far precedere una prova orientativa allo scopo di ottenere informazioni per definire l'intervallo di concentrazioni da impiegare Oltre alla serie di saggi con la sostanza da

esaminare, viene effettuato un esperimento di controllo senza la sostanza, impiegando se appropriato, le eventuali sostanze ausiliari. Le concentrazioni non dovrebbero diminuire di più del 20 % durante il periodo di prova. A seconda delle proprietà chimiche e fisiche del composto in esame, si dovrebbe decidere se per soddisfare a questa esigenza si debba procedere ad una prova statica, semistatica o con flusso continuo.

I pesci vengono esposti alla sostanza nel modo indicato di seguito:

— durata:

48 ore come minimo, ma di preferenza 96 ore;

— numero di animali:

almeno 10 per concentrazione;

— vasche:

di capacità opportuna secondo il carico raccomandato;

— carico:

per i saggi statici e semistatici si raccomanda un carico massimo di 1,0 g/l; per i sistemi a flusso continuo puo essere accettabile un carico più elevato;

— concentrazione di saggio:

un controllo e almeno cinque concentrazioni diverse per un fattore costante non superiore ad 1,8, e tali da causare una mortalità variabile fra lo 0 e i 100 %.

— acqua:

vedi punto 1.6.1.2;

— illuminazione:

fotoperiodo quotidiano: da 12 a 16 ore al giorno;

— temperatura:

appropriata alla specie, ma con variazioni di ± 1 °C per ciascuna prova;

— concentrazione dell'ossigeno disciolto:

non meno del 60 % del valore di saturazione dell'aria alla temperatura prescelta;

— alimentazione:

nessuna.

I pesci sono esaminati dopo le prime 2—4 ore ed almeno a intervalli di 24 ore. Essi sono considerati morti se toccando il peduncolo caudale non si ha alcuna reazione e non vi sono visibili movimenti respiratori. I pesci morti sono allontanati al momento in cui vengono osservati e le mortalità devono essere registrate. Va presa nota delle anormalità visibili (come la perdita di equilibrio, cambiamento nel comportamento alla natazione, la funzione respiratoria, la pigmentazione, ecc.). Il pH, l'ossigeno disciolto e la temperatura devono essere misurati quotidianamente.

DATI E VALUTAZIONE

Per ciascun periodo di esposizione raccomandato, riportare la mortalità percentuale in funzione della concentrazione, su carta logaritmica/probabilistica. Tracciare ad occhio una linea che si adatti ai punti e leggere le concentrazioni corrispondenti alla risposta del 50 % (vedi figura in appendice 3).

Tale valore è una stima della CL_{50} per l'appropriato periodo di esposizione.

Quando i dati sono adeguati, la concentrazione mediana CL_{50} ed i limiti di confidenza ($p = 0,05$) possono essere valutati impiegando procedimenti standard.

Il valore della CL_{50} dovrebbe essere arrotondato ad una cifra significativa (o al massimo a 2).

Nei casi in cui la pendenza della curva di concentrazione/risposta percentuale è troppo ripida per permettere il calcolo della CL_{50}, è sufficiente una determinazione grafica di tale valore. Quando due concentrazioni consecutive nel rapporto di 1,8 danno soltanto mortalità dello 0 e del 100 %, questi due valori sono sufficienti per indicare l'intervallo di grandezza entro il quale è situata la CL_{50}.

Qualora si osservasse che la stabilità o l'omogeneità della sostanza in esame non può essere mantenuta, tale fatto dovrebbe essere indicato nella relazione e l'interpretazione dei risultati dovrebbe essere fatta con prudenza.

3. RELAZIONE

La relazione sul saggio conterrà, se possibile:

- dati sull'organismo impiegato per la prova (nome scientifico, ceppo, fornitore, eventuali trattamenti preliminari, grandezza e numero impiegato per ciascuna concentrazione di saggio);
- elenco delle concentrazioni impiegate e qualsiasi dato disponibile sulla stabilità del prodotto chimico in esame alle concentrazioni nella soluzione di saggio;
- descrizione dell'apparecchio di prova;
- qualora siano effettuate analisi chimiche, metodi impiegati e risultati devono essere riportati;
- origine dell'acqua impiegata per la diluizione e sue principali caratteristiche chimiche (pH, durezza, temperatura);
- concentrazione di ogni sostanza ausiliaria;
- nel caso di sostanze scarsamente solubili in acqua, metodo di preparazione della soluzione di riserva e di quella di saggio;
- ragioni per la scelta del metodo di saggio e particolari sul procedimento impiegato (ad esempio, durata della prova, procedimento statico, semistatico o a flusso continuo, tasso di dosaggio, velocità di flusso, eventuale aerazione, carico di pesci, ecc.);
- regime di illuminazione;
- la più elevata concentrazione saggiata che non provoca mortalità entro il periodo di prova;
- la più bassa concentrazione saggiata che provoca una mortalità del 100 % entro il periodo di prova;
- mortalità cumulativa a ciascuna concentrazione e nel controllo (o controllo addizionato, se del caso, delle sostanze ausiliari) ai tempi di osservazione raccomandati;
- valori della CL_{50} per ciascuno dei tempi di osservazione raccomandati (accompagnati, se possibile, dai limiti di confidenza al 95 %);
- procedimenti statistici impiegati per determinare i valori della CL_{50};
- grafico della curva concentrazione/percento di risposta alla fine del saggio e la pendenza;
- se possibile, pendenza della curva concentrazione/percento di risposta alla fine del saggio, con i relativi limiti di confidenza al 95 %;
- concentrazione dell'ossigeno disciolto, valori del pH e temperatura delle soluzioni in esame ogni 24 ore;
- qualora venga impiegata una sostanza di riferimento, i risultati ottenuti devono essere riportati;
- evidenza che i criteri di qualità sono stati rispettati.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C (81) 30 Final.

Appendice 1

Acqua ricostituita

Esempio di acqua di diluizione appropriata

Tutti i prodotti chimici devono avere purezza analitica. Dovrebbe essere impiegata acqua distillata di buona qualità oppure acqua deionizzata, di conduttività inferiore a 5 μScm^{-1}.

Soluzioni di riserva

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (calcio cloruro diidrato):	11,76 g
Sciogliere e portare ad un litro con acqua.	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesio solfato eptaidrato):	4,93 g
Sciogliere e portare ad un litro con acqua.	
$NaHCO_3$ (sodio bicarbonato):	2,59 g
Sciogliere e portare ad un litro con acqua.	
KCl (potassio cloruro):	0,23 g
Sciogliere e portare ad un litro con acqua.	

Acqua di diluizione ricostituita

Mescolare 25 ml di ciascuna delle quattro soluzioni di riserva e portare ad un litro con acqua.

Aerare finché la concentrazione dell'ossigeno disciolto uguagli il valore di saturazione per l'aria.

Il pH dovrebbe essere di 7,9 ± 0,3.

Se necessario regolare il pH mediante aggiunte di NaOH (sodio idrossido) o HCl (acido cloridrico).

L'acqua di diluizione così preparata viene lasciata da parte per circa 12 ore e non richiede alcuna ulteriore aerazione.

La somma degli ioni Ca e Mg in questa soluzione è di 2,5 mmol/l. Il rapporto ioni Ca/Mg deve essere di 4:1 e quello degli ioni Na/K è di 10:1. L'alcalinità totale di questa soluzione è 0,8 mmol/l.

Eventuali deviazioni nel modo di preparare l'acqua di diluizione non devono modificarne la composizione o le proprietà.

Appendice 2

Specie di pesci raccomandate per il saggio

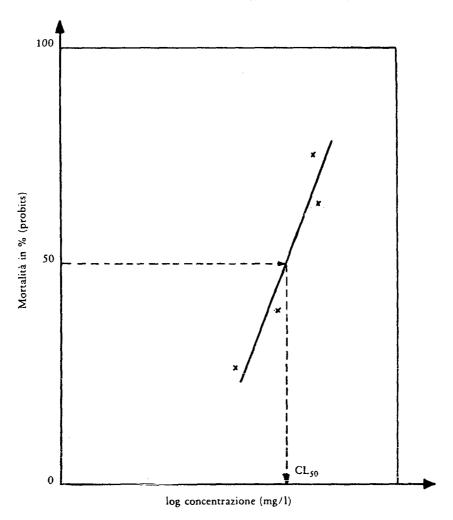
Specie raccomandate	Intervallo di temperatura raccomandato per il saggio (°C)	Lunghezza totale raccomandata per animali da saggio (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Pesce zebra	da 20 a 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) Fathead minnow	da 20 a 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Carpa comune	da 20 a 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Red Killifish	da 20 a 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	da 20 a 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Linneaus 1758) Bluegill	da 20 a 24	5,0 ± 2,0
Salmo gairdneri (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Trota arcobaleno	da 13 a 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Golden orfe	da 20 a 24	6,0 ± 2,0

Raccolta

I pesci suelencati sono allevabili facilmente e/o sono largamente disponibili per tutto l'anno. Possono riprodursi e essere mantenuti sia in stabilimenti di acquicoltura sia in laboratorio, sotto condizioni di controllo delle malattie e dei parassiti, in modo che gli animali di saggio saranno sani e geneticamente controllati. Questi pesci sono disponibili in molte parti del mondo.

Appendice 3

Esempio di curva concentrazione / percento di mortalità

Esempio di determinazione della CL_{50} usando carta log-probit

Appendice 4

Elenco di esempi di procedure standard

(1) OECD, Paris, 1981, test guideline 203, Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) ISO/TC/147/SC 5/WG/3 — Draft proposal for screening chemicals and products for acute toxicity to fish using a static, semi-static or flow-through method — Document 7346/I, II, III, 1980/06/15 ISO/DP.

(3) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungs-methoden — Part II 1974.

(4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen. 38 412 (L1) und L (15).

(5) AFNOR. Determination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis de Brachydanio rerio. T90-303.

(6) JIS K 0102. Acute toxicity test for fish.

(7) Degradability, Ecotoxicity and Bioaccumulation. The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment, Volume I and II, Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands 1980.

(8) Environmental Protection Agency 1975. Methods for the Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates and Amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms. Ecological Research Series EPA-660-75-009.

(9) Environmental Protection Agency. January 1978. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development. EPA-600/4/78/012.

(10) Environmental Protection Agency: Toxic Substance Control, March 16 1979, Part IV.

(11) Standard methods for the Examination of Water and Wastewater. 14th edition 1975 APHA-AWWA-WPCF.

(12) Commission of the European Communities. Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. CEE Study D.8368, 22 March 1979.

(13) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for Evaluating dose Effects Experiments, J. Pharm. Exp. Therap., Vol. 96, 1949, p. 99.

C. 2. TOSSICITA ACUTA PER LE *DAPHNIA*

1. METODO

1.1. Introduzione

Prima di iniziare il saggio è desiderabile disporre delle maggiori informazioni possibili concernenti la solubilità in acqua, la tensione di vapore, la stabilità chimica, le costanti di dissociazione e la biodegradabilità della sostanza in esame.

Per la programmazione del saggio e per l'interpretazione dei risultati dovrebbero essere presi in considerazione anche altri dati (ad esempio la formula di struttura, il grado di purezza, la natura e la percentuale delle impurezze significative, la presenza e la quantità di additivi e il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua).

1.2. Definizione e unità

Il disposto della direttiva concernente la CL_{50} per la *Daphnia* è da considerarsi soddisfatto dalla determinazione della CE_{50} come descritto nel presente metodo.

Ai fini di questa prova, la tossicità acuta viene espressa come concentrazione effettiva mediana (CE_{50}) per l'immobilizzazione. Essa è la concentrazione (come valori iniziali) capace di immobilizzare il 50 % delle Daphnia di un gruppo di saggio entro un periodo di esposizione di 24 ore. Ove fattibile si può anche procedere alla determinazione della CE_{50} per l'immobilizzazione a 48 ore.

Immobilizzazione:

Sono considerati immobili gli animali che, dopo lieve agitazione del recipientè di saggio, non sono in grado di nuotare per 15 secondi.

Tutte le concentrazioni della sostanza in esame sono espresse in peso/peso (parti per milione).

1.3. Sostanze di riferimento

Per dimostrare che, nelle condizioni sperimentali di laboratorio, la sensibilità della specie di saggio non è variata in modo significativo può essere impiegata una sostanza di riferimento.

Per la presente prova non vengono specificate sostanze di riferimento.

1.4. Principio del metodo di saggio

Le dafnie sono esposte per 24 ore alla sostanza in esame, aggiunta all'acqua in varie concentrazioni; ove necessario, la durata dell'esposizione può essere portata a 48 ore. In condizioni sperimentali altrimenti identiche e in un intervallo adeguato di concentrazioni della sostanza in esame, concentrazioni diverse di una data sostanza in esame esercitano di solito effetti diversi sulla capacità natatoria della *Daphnia*.

A concentrazioni diverse, si ottengono percentuali diverse di *Daphnia* che alla fine della prova non sono più in grado di nuotare. Le concentrazioni in grado di immobilizzare lo 0 o il 100 % delle dafnie, si ricavano direttamente dalle osservazioni sperimentali. Mentre la CE_{50} a 24 ore (o la CE_{50} a 48 ore) viene determinata, se possibile, per calcolo.

Per il presente metodo si impiega un sistema statico, quindi le soluzioni non sono rinnovate durante il periodo di esposizione.

1.5. Criteri di qualità

Alla fine della prova l'immobilizzazione delle dafnie usate come controllo non deve superare il 10 %.

Alla fine della prova la concentrazione dell'ossigeno non deve essere inferiore a 2 mg/l.

Le *Daphnia* usate per il saggio non dovrebbero restare bloccate alla superficie dell'acqua, almeno nel gruppo di controllo.

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Reattivi*

1.6.1.1. Soluzioni delle sostanze da saggiare

Soluzioni di riserva di opportune concentrazioni vengono preparate sciogliendo la sostanza in acqua deionizzata o in acqua come indicata al punto 1.6.1.2.

Per le sostanze scarsamente solubili in acqua, le soluzioni di riserva possono essere preparate per dispersione ultrasonica, o, se necessario, impiegando solventi organici, emulsionanti o disperdenti. Qualora si impieghino tali prodotti ausiliari, le dafnie del gruppo di controllo devono essere esposte a tali sostanze nella stessa concentrazione alla quale esse accompagnano la più elevata concentrazione della sostanza in esame. La concentrazione di tali prodotti ausiliari non dovrebbe superare 0,1 g/l.

Le concentrazioni scelte per il saggio sono preparate per diluizione della soluzione di riserva. Qualora si proceda al saggio di concentrazioni elevate, la sostanza può essere disciolta direttamente nell'acqua di diluizione.

Il saggio dovrebbe essere effettuato senza regolazione del pH. Se quest'ultimo manifestasse notevoli variazioni si consiglia di ripetere la prova aggiustando il pH e riportando i risultati. In questo caso, il pH della soluzione di riserva dovrebbe essere portato al valore del pH della soluzione acquosa, salvo specifiche ragioni in contrario. Per la regolazione del pH vanno preferiti HCl e NaOH. Questo aggiustamento del pH dovrebbe essere effettuato in modo che la concentrazione della sostanza in esame nella soluzione di riserva non cambi in modo significativo. Qualora la regolazione del pH dovesse provocare una reazione chimica o una precipitazione fisica della sostanza in esame, ciò dovrebbe essere riportato.

1.6.1.2. Acqua di coltura e di diluizione

Per la presente prova può essere impiegato qualsiasi tipo d'acqua, sia naturale che ricostituito (vedi appendice), purché adatto alla coltura delle dafnie. Per evitare la necessità di un adattamento prima del saggio, si raccomanda di impiegare una coltura di qualità identica a quella dell'acqua di coltura per il saggio.

1.6.2. *Apparecchiatura*

Dovrebbero essere utilizzate normali apparecchiature e strumentazioni di laboratorio. Gli apparecchi destinati a venire a contatto con le soluzioni del saggio dovrebbero essere preferibilmente completamente in vetro:

— misuratore di ossigeno (con microelettrodo od altro apparecchio adatto per la misurazione dell'ossigeno in campioni di piccolo volume);

— adeguata apparecchiatura per il controllo della temperatura;

— pH-metro;

— apparecchiatura per la determinazione della durezza dell'acqua.

1.6.3. *Organismi per il saggio*

Daphnia magna o *Daphnia pulex*, di età compresa fra 6 e 24 ore, all'inizio del saggio, allevate in laboratorio, esenti da malattie palesi e di cui sia nota la storia (ad esempio, allevamento, qualsiasi trattamento preliminare, ecc.).

1.6.4. *Procedura del saggio*

Al saggio definitivo si può fare precedere una prova orientativa allo scopo di ottenere informazioni sull'intervallo di concentrazioni da impiegare nel saggio principale. Oltre alla serie di saggi sulla sostanza da esaminare, dovrebbe essere effettuato un saggio di controllo, con l'impiego di ogni prodotto ausiliario usato, ma senza la sostanza da esaminare.

Le *Daphnia* vengono esposte alla sostanza nel modo sotto descritto:

— durata:

almeno 24 ore;

— numero di animali:

almeno 20 animali per ciascuna concentrazione di saggio, di preferenza divisi in 4 gruppi di 5 individui ciascuno o in 2 gruppi di 10;

— carico:

almeno 2 ml della soluzione in esame dovrebbero essere usati per ciascun animale;

— concentrazione di saggio:

la soluzione da esaminare dovrebbe essere preparata immediatamente prima dell'introduzione delle *Daphnia* preferibilmente senza impiegare solventi diversi dall'acqua.

Le concentrazioni sono preparate in serie con progressione geometrica, con rapporto uguale ad 1,8. Insieme al gruppo di controllo, dovrebbero essere sperimentate concentrazioni sufficienti ad ottenere l'immobilizzazione dello 0 e del 100 % degli animali di saggio dopo 24 ore, nonché un intervallo di percentuali di immobilizzazioni intermedie che permettano il calcolo della CE_{50} a 24 ore;

— acqua:

vedi punto 1.6.1.2;

— illuminazione:

l'alternanza illuminazione-oscurità è facoltativa; la completa oscurità è accettabile;

— temperatura:

la temperatura del saggio dovrebbe essere compresa tra 18 e 22 °C ma dovrebbe essere costante per ogni singola prova entro un intervallo di ± 1 °C;

— aerazione:

le soluzioni del saggio non devono essere aerate con gorgogliamento d'aria;

— alimentazione:

nessuna.

Alla fine della prova dovrebbero essere misurati il pH e la concentrazione di ossigeno dei controlli e di tutte le concentrazioni della sostanza in esame; il pH delle soluzioni della sostanza in esame non dovrebbe essere modificato.

I composti volatili dovrebbero essere saggiati in recipienti chiusi e riempiti per intero, abbastanza grandi da evitare che l'ossigeno venga a mancare.

Le dafnie vengono esaminate dopo almeno 24 ore di esposizione, e di nuovo dopo 48 ore se la prova è stata prolungata.

2. DATI E VALUTAZIONE

Riportare in grafico su carta logaritmica-probabilistica l'immobilizzazione percentuale cumulativa a ciascuna concentrazione, dopo almeno 24 ore di esposizione, in funzione della concentrazione. Congiungere i punti con la curva che meglio si adatta ad essi, e leggere la concentrazione corrispondente alla risposta del 50 %.

Ove i dati sono adeguati, la concentrazione mediana e i suoi limiti di confidenza ($p = 0,05$) possono essere valutati con procedimenti standard. Il valore della CE_{50} dovrebbe essere arrotondato ad una

cifra (o massimo 2 cifre) significativa(e). Nei casi in cui la pendenza della curva *concentrazione/* percento di risposta è troppo rapida per consentire il calcolo della CE_{50} è sufficiente una valutazione grafica di tale valore.

Quando due concentrazioni immediate consecutive, nel rapporto 1,8 danno soltanto un'immobilizzazione allo 0 e al 100 %, questi due valori sono sufficienti ad indicare il campo entro il quale è compresa la CE

Qualora si osservasse che la stabilità e l'omogeneità della sostanza in esame non possa essere mantenuta il fatto va riportato e l'interpretazione dei risultati dovrebbe essere fatta con cautela.

3. RELAZIONE

La relazione del saggio conterrà, se possibile:

- dati sull'organismo impiegato per il saggio (nome scientifico, ceppo, fornitori o fonte, eventuali trattamenti preliminari, metodo di allevamento, comprendente la fonte, il tipo e la quantità di alimento e la frequenza di alimentazione),
- numero di *Daphnia* impiegate per ciascuna concentrazione di saggio,
- elenco delle concentrazioni impiegate, nonché ogni dato disponibile sulla stabilità della sostanza in esame alle concentrazioni impiegate nella soluzione di saggio,
- descrizione dei recipienti di saggio, indicazione del volume di soluzione in ciascuno di essi, numero di animali per recipiente,
- metodi e risultati delle eventuali analisi chimiche,
- sorgente dell'acqua di diluizione e sue principali caratteristiche chimiche,
- metodo di preparazione delle soluzioni di riserva e di saggio,
- concentrazioni di ogni eventuale prodotto ausiliario impiegato (solventi organici, disperdenti, ecc.),
- regime di illuminazione,
- massima concentrazione saggiata che non provoca immobilizzazione nel periodo del saggio,
- minima concentrazione saggiata che provoca l'immobilizzazione del 100 % degli animali nel periodo del saggio,
- immobilizzazioni cumulative nel «bianco», nel controllo contenente la sostanza ausiliaria e in ciascuna concentrazione saggiata secondo i tempi di osservazione raccomandati (24 o 24 e 48 ore),
- valori del CE_{50} per ciascuno dei tempi di osservazione raccomandati (accompagnati, se possibile, dai limiti di confidenza al 95 %),
- grafico della curva concentrazione/percento di risposta alla fine del saggio,
- procedimenti statistici impiegati per determinare il valore della CE_{50},
- se possibile, inclinazione della curva concentrazione/percento di risposta, a 24 ore, coi relativi limiti di confidenza al 95 %,
- concentrazione dell'ossigeno disciolto, valori del pH, temperatura delle soluzioni del saggio,
- se si impiega una sostanza di riferimento, nome e risultati ottenuti devono essere riportati,
- evidenza del fatto che i criteri di qualità sono stati rispettati.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 202. Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) ISO Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera — crustacea*) ISO/6341.

(3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera — crustacea*) NFT 90 301 (April 1984).

(4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).

Appendice

Acqua ricostituita

Esempio di acqua adatta per la diluizione

Tutti i prodotti chimici impiegati devono avere purezza analitica. L'acqua deve essere acqua distillata di buona qualità, con una conduttività inferiore ai 5 μScm^{-1}.

Soluzioni di riserva

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (calcio cloruro diidrato):	11,76 g
Sciogliere e portare a un litro con acqua.	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesio solfato eptaidrato):	4,93 g
Sciogliere e portare a un litro con acqua.	
$NaHCO_3$ (sodio bicarbonato):	2,59 g
Sciogliere e portare a un litro con acqua.	
KCl (potassio cloruro):	0,23 g
Sciogliere e portare a un litro con acqua.	

Acqua di diluizione ricostituita

Miscelare 25 ml di ognuna delle quattro soluzioni di riserva e portare a un litro con acqua.

Aerare finché la concentrazione dell'ossigeno disciolto è uguale al valore di saturazione dell'aria.

Il pH dovrebbe essere uguale a 7,9 ± 0,3. Se necessario, aggiustare il pH con NaOH (sodio idrossido) o HCl (acido cloridrico). L'acqua di diluizione così preparata viene lasciata da parte per circa 12 ore e non necessita di alcuna ulteriore aerazione.

La somma degli ioni Ca e Mg in questa soluzione è uguale a 2,5 mmol/l. Il rapporto ioni Ca/Mg è di 4:1 e quello degli ioni Na/K è di 10:1. L'alcalinità totale della soluzione è 0,8 mmol/l.

Ogni deviazione nella preparazione dell'acqua di diluizione non deve modificare la composizione o le proprietà dell'acqua.

C. 3. DEGRADAZIONE

DEGRADAZIONE BIOTICA: METODO OCSE MODIFICATO (PROVA ORIENTATIVA)

1. METODO

1.1. Introduzione

Il presente metodo è destinato alla determinazione della biodegradabilità in ambiente acquoso aerobio dei composti organici idrosolubili non volatili, a una concentrazione iniziale corrispondente a 5—40 mg/l DOC (carbonio organico disciolto). Qualora i limiti di sensibilità degli apparecchi per l'analisi del carbonio organico dovessero essere migliorati, l'impiego di concentrazioni più basse potrà essere vantaggioso particolarmente per i composti tossici. Deve essere determinato il contenuto in carbonio organico del materiale in esame.

Il metodo può essere applicato esclusivamente ai prodotti organici che, alle concentrazioni impiegate per la prova:

— sono solubili in acqua almeno alle concentrazioni da esaminare (5—40 mg/l DOC);

— hanno una tensione di vapore trascurabile;

— non esercitano effetti inibitori sui batteri;

— non risultano assorbiti in modo significativo sulle superfici di vetro.

La disponibilità di dati sulle proporzioni relative dei principali componenti del prodotto da esaminare sara utile per interpretare i risultati ottenuti, particolarmente nei casi in cui i valori trovati sono bassi o non significativi.

La disponibilità di dati sulla tossicità del prodotto chimico nei confronti dei microorganismi potrà essere utile per l'interpretazione degli eventuali valori bassi e per la scelta delle concentrazioni sperimentali appropriate.

1.2. Definizione ed espressione dei risultati

La degradazione di definisce come la rimozione percentuale di DOC rispetto a quello della sostanza in esame:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

dove:

D_t = degradazione, come percentuale di rimozione del DOC al momento t,

C_0 = concentrazione di partenza del DOC nel terreno di coltura (mg/l DOC),

C_t = concentrazione del DOC nel terreno di coltura al momento t (mg/l DOC),

$C_{bl(0)}$ = concentrazione di partenza del DOC nel «bianco» (mg/l DOC),

$C_{bl(t)}$ = concentrazione del DOC nel «bianco» al momento t (mg/l DOC).

1.3. Sostanze di riferimento

E raccomandabile l'impiego di opportuni prodotti chimici di riferimento per controllare l'attività dell'inoculo. A questo fine possono essere impiegati ad esempio anilina, acetato di sodio o benzoato di sodio; essi devono dimostrare una rimozione del DOC uguale o superiore al 70 % entro 10 giorni, a partire dal momento in cui la biodegradazione osservata supera per la prima volta il 10 %. Questi risultati devono essere ottenuti entro i 28 giorni di durata della prova; in caso contrario, la prova stessa non è considerata valida e deve essere ripetuta utilizzando un inoculo di altra fonte.

1.4. **Principio del metodo**

Una quantità prestabilita del composto viene disciolta in un terreno inorganico (soluzione nutritiva minerale, rinforzata con oligoelementi e una soluzione di vitamine essenziali), in modo da ottenere una concentrazione corrispondente a 5—40 mg/l come DOC. La soluzione viene inoculata con un piccolo numero di microorganismi di una popolazione mista e sottoposta ad aerazione a 20—25 °C, al buio o tutt'al più in una luce diffusa.

La degradazione viene seguita attraverso l'analisi del DOC per la durata di 28 giorni.

Il procedimento viene controllato mediante una sostanza di riferimento.

E necessario un «bianco» per il DOC, da determinarsi in una prova in parallelo senza aggiunta del materiale in esame o del prodotto di controllo.

1.5. **Criteri di qualità**

La riproducibilità del metodo è stata stabilita nel saggio circolare svolto dall'OCSE e dalla CEE.

La più bassa concentrazione del composto da esaminare per la quale il presente metodo può essere impiegato è essenzialmente determinata dal limite di sensibilità dell'apparecchio per il dosaggio del carbonio organico (che attualmente è di 0,5 mg/l come C) nonché dalla concentrazione del carbonio organico disciolto nella soluzione nutritiva.

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. *Reattivi*

1.6.1.1. Acqua distillata

Per l'impiego generale come solvente deve essere utilizzata acqua deionizzata o distillata, esente da sostanze tossiche (in particolare da rame). Può essere impiegata acqua deionizzata per distillazione o scambio ionico.

L'acqua distillata non deve contenere carbonio organico in quantità superiore al 10 % di quello introdotto con la sostanza da esaminare.

Per le analisi del DOC nel campo di concentrazione di 0—40 mg/l è necessaria acqua distillata di elevata purezza. Le eventuali contaminazioni possono derivare da impurezze dell'acqua, ma anche provenire dalle resine a scambio ionico e dallo sviluppo di microorganismi (batteri, alghe, sotto l'influenza della luce, ecc.). Per ogni serie di determinazioni deve essere impiegata acqua di una sola partita, che deve essere sottoposta a verifica preliminare mediante analisi del DOC. Se necessario, la purificazione dell'acqua può essere ottenuta mediante irradiazione UV o con altri procedimenti.

1.6.1.2. Soluzione nutritiva

In ogni litro della soluzione nutritiva deve essere contenuto un ml di ciascuna delle seguenti soluzioni (da a ad f), preparate con acqua (1.6.1.1) e con reagenti puri per analisi (RPA):

a) KH_2PO_4 (potassio fosfato monobasico): 8,50 g RPA
K_2HPO_4 (potassio fosfato bibasico): 21,75 g RPA
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (sodio fosfato bibasico diidrato): 33.40 g RPA
NH_4Cl (ammonio cloruro): 20,00 g RPA
Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).
Il pH deve essere uguale a 7,2.

b) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesio solfato eptaidrato): 22,50 g RPA
Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).

c) $CaCl_2$ (calcio cloruro): 27,50 g RPA
Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).

d) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (ferro (III) cloruro esaidrato): 0,25 g RPA

Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1). Questa soluzione deve essere preparata immediatamente prima dell'uso.

e) Soluzione di oligoelementi:

$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (manganese (II) solfato tetraidrato) (= 30,23 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$):	39,9 mg RPA
H_3BO_3 (acido borico):	57,2 mg RPA
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (zinco solfato eptaidrato):	42,8 mg RPA
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (ammonio eptamolibdato (VI)) (= 36,85 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$):	34,7 mg RPA
$FeCl_3 \cdot EDTA$ (chelato di ferro)	100,0 mg RPA

Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).

La soluzione madre degli oligoelementi deve essere sterilizzata a 120 °C e 2 atmosfere per 20 minuti.

f) Soluzione di vitamine:

Biotina:	0,2 mg RPA
Acido nicotinico:	2,0 mg RPA
Tiamina:	1,0 mg RPA
Acido p-amminobenzoico:	1,0 mg RPA
Acido pantotenico:	1,0 mg RPA
Piridossamina:	5,0 mg RPA
Cianocobalamina:	2,0 mg RPA
Acido folico:	5,0 mg RPA

Sciogliere e portare a 100 ml con acqua (1.6.1.1).

La soluzione deve essere sterilizzata per filtrazione attraverso membrana da 0,2 µm. In luogo della soluzione 1.6.1.2 (f), possono essere impiegati 15 mg di estratto di lievito in 100 ml di acqua (1.6.1.1).

1.6.1.3. Sostanze di riferimento

Anilina (distillata prima dell'uso), acetato di sodio, benzoato di sodio.

1.6.1.4. Soluzione di cloruro mercurico

Soluzione all'1 % di $HgCl_2$ in acqua (1.6.1.1).

1.6.2. *Apparecchiatura*

1.6.2.1. Apparecchio agitatore per beute da 2 l, con regolazione automatica della temperatura od impiegato in un locale a temperatura costante a 20—25 °C.

1.6.2.2. Beute da 2 l a collo stretto (preferibili quelle dotate di rilievi o scanalature). Prima dell'uso, le beute devono essere accuratamente pulite, ad esempio con soluzione alcolica di acido cloridrico, risciacquate ed essiccate, per evitare ogni contaminazione dovuta a residui di precedenti prove. Le beute devono essere pulite anche se vengono adoperate per la prima volta, in quanto potrebbero essere contaminate.

1.6.2.3. Apparecchiatura per filtrazione su membrana.

1.6.2.4. Membrane filtranti da 0,2 µm.

1.6.2.5. Apparecchio per l'analisi del carbonio.

1.6.3. *Preparazione dell'inoculo*

Per la preparazione dell'inoculo può essere impiegata una qualsiasi delle 4 fonti sotto indicate. L'efficienza dell'inoculo stesso deve essere controllata mediante una sostanza di riferimento (1.6.1.3).

1.6.3.1. Inoculo proveniente da un effluente secondario

L'inoculo deve essere ricavato di preferenza da un effluente secondario di buona qualità, raccolto da un impianto di depurazione che tratta prevalentemente scarichi domestici. Nel periodo compreso fra il prelevamento e l'impiego l'effluente deve essere mantenuto in condizioni aerobie. Per preparare l'inoculo, filtrare il campione con un filtro a grande porosità, eliminando i primi 200 ml. Il filtrato deve essere mantenuto in condizioni aerobie fino al momento dell'impiego. L'inoculo deve essere utilizzato il giorno stesso in cui viene prelevato.

1.6.3.2. Inoculo dal terreno

Sospendere 100 g di terreno (fertile, non sterile) in 1 000 ml di acqua potabile esente da cloro (i terreni con un contenuto eccessivo di argilla, di sabbia o carbonio organico non sono adatti). Dopo agitazione, lasciar riposare la sospensione per 30 minuti.

Filtrare il surnatante su carta a grande porosità, eliminando i primi 200 ml. Aerare immediatamente, e l'aerazione viene continuata per tutta la durata dell'uso. L'inoculo deve essere impiegato il giorno in cui viene prelevato.

1.6.3.3. Inoculo proveniente da un'acqua superficiale

L'inoculo può essere ottenuto da un'opportuna acqua superficiale. Filtrare il campione su carta a grande porosità, eliminando i primi 200 ml. Mantenere il filtrato in condizioni aerobie fino al momento dell'impiego. L'inoculo deve essere impiegato lo stesso giorno in cui viene prelevato.

1.6.3.4. Inoculo composto

Mescolare bene volumi uguali dei 3 campioni di inoculo e ricavare l'inoculo finale da tale miscela.

Controllare l'idoneità dell'inoculo mediante una sostanza di riferimento (1.6.1.3).

1.6.4. *Procedimento*

L'esame delle sostanze da analizzare deve essere effettuato in doppio, contemporaneamente, insieme alla sostanza di riferimento (1.6.1.3). Per la determinazione del DOC del «bianco» deve essere effettuata contemporaneamente una prova di controllo, con aggiunta dell'inoculo, ma priva sia del prodotto da esaminare che del prodotto di riferimento.

Preparare una soluzione madre in acqua (1.6.1.1) del prodotto da esaminare. Aggiungere alla soluzione nutritiva (1.6.1.2) un volume della soluzione madre tale da raggiungere una concentrazione di carbonio pari a 5—40 mg/l DOC. Il prodotto di riferimento (1.6.1.3) deve essere esaminato a una concentrazione inizale corrispondente a 20 mg/l DOC.

Porre 900 ml della soluzione nutritiva in due beute (1.6.2.2) e inoculare con porzioni da 0,5 ml/l dell'inoculo (1.6.3). Coprire l'apertura del recipiente, ad esempio con foglio di alluminio, in modo da non impedire eccessivamente lo scambio di aria tra il recipiente e l'atmosfera circostante (l'ovatta non è idonea, in quanto si deve effettuare l'analisi del DOC). Introdurre poi i recipienti nell'apparecchio agitatore. Durante tutta l'operazione, la temperature 20—25 °C deve essere mantenuta invariata, e i recipienti devono essere protetti dalla luce. L'aria deve essere esente da contaminanti e prodotti tossici (solventi clorurati, ecc.).

Nel corso della prova di biodegradazione, le concentrazioni del DOC vengono determinate in doppio, il primo, il ventisettesimo e il ventottesimo giorno. Per seguire il corso della degradazione devono essere effettuate almeno altre tre analisi, intorno al settimo, al quattordicesimo e al ventunesimo giorno.

Per ciascuna determinazione deve essere prelevato soltanto il volume necessario di campione. La centrifugazione o la filtrazione su membrana prima della determinazione effettiva del carbonio richiedono volumi diversi a seconda degli strumenti. Le perdite per evaporazione del terreno di coltura devono essere compensate aggiungendo acqua (1.6.1.1) nelle quantità necessarie.

Agitare bene la soluzione prima di prelevare il campione. Il materiale aderente alla parete dei recipienti deve essere disciolto o portato in sospensione prima del prelievo La filtrazione su membrana o la

centrifugazione devono essere effettuate immediatamente. I campioni filtrati o centrifugati devono essere analizzati lo stesso giorno; in caso contrario, essi devono essere conservati mediante l'aggiunta di 0,05 ml della soluzione $HgCl_2$ (1.6.1.4) per ogni 10 ml di campione, oppure essere posti in frigorifero a 2—4 °C al massimo per 24 ore, o a − 18 °C per periodi più lunghi. Se si ha un valore costante prima del ventottesimo giorno il test può essere sospeso.

Se al ventottesimo giorno la degradazione è chiaramente iniziata, ma non ha ancora raggiunto un valore costante, è buona pratica prolungare l'esperimento per una o due settimane.

In tutte le fasi è necessaria una grande cura e la massima pulizia (ma non la sterilità) dei recipienti, delle pipette, ecc.

1.6.5. *Determinazione del DOC*

Le membrane filtranti sono adatte soltanto se non cedono carbonio e non assorbono la sostanza durante la filtrazione. L'eventuale centrifugazione dei campioni deve essere effettuata a 40 000 ms^{-2} (~ 4 000 g) per 15 minuti, di preferenza in una centrifuga refrigerata, in ogni caso sotto i 40 °C.

Nota

La differenziazione TOC—DOC per centrifugazione a concentrazioni molto basse non sembra molto efficace, in quanto i batteri non vengono allontanati totalmente, oppure il carbonio facente parte del plasma batterico viene ridisciolto. A concentrazioni più elevate (⩾ 10 mg/l C) e con la stessa piccola quantità di inoculo l'errore dovuto alla centrifugazione sembra essere relativamente piccolo.

Il campione prelevato dalla soluzione (30 ml circa) deve essere immediatamente centrifugato o filtrato su membrana nell'apparecchio (1.6.2.3), impiegando membrane filtranti conformi al punto (1.6.2.4). I primi 20 ml di filtrato vanno eliminati.

La concentrazione del DOC deve essere determinata due volte nel filtrato residuo (10 ml) mediante lo strumento TOC/DOC (1.6.2.5). Se il filtrato non può essere analizzato lo stesso giorno, esso va conservato come indicato al punto 1.6.4.

2. DATI E VALUTAZIONI

I risultati analitici devono essere registrati sulla scheda allegata (appendice 1) e i valori della biodegradazione devono essere calcolati come indicato al punto 1.2.

Le concentrazioni del DOC devono essere calcolate con l'approssimazione di 0,1 mg/l. Le medie dei valori D_t devono essere arrotondate all'unità percentuale più vicina.

Il corso della degradazione deve essere seguito su un grafico come indicato nell'accluso esempio (appendice 2).

I risultati della prova sono ritenuti validi se sono rispettate le seguenti condizioni: nella stessa serie di determinazioni, la sostanza di riferimento deve mostrare rimozione del DOC ⩾ al 70 % entro 10 giorni, a partire dal momento in cui il livello di biodegradazione osservato supera per la prima volta il 10 %. Questo risultato deve essere ottenuto entro i 28 giorni di durata della prova, in caso contrario, l'intera serie deve essere scartata.

3. RELAZIONE

3.1. Resoconto della prova

Il resoconto deve comprendere, se possibile:

— i dati, riferiti conformemente alla scheda acclusa (appendice 1);

— l'andamento del saggio di degradazione è rappresentato graficamente in un diagramma che mostra la fase latente, la fase di degradazione, la pendenza e il «Time window» («Time window» indica qui un periodo di 10 giorni, che inizia dal giorno in cui il livello osservato di biodegradazione supera per la prima volta il 10 %);

— la convalida della prova (la sostanza di riferimento deve presentare una rimozione del DOC ⩾ al 70 % entro 10 giorni, a partire dal momento in cui la degradazione supera il 10 % ; questo risultato deve essere ottenuto durante i 28 giorni di durata della prova).

3.2. Interpretazione dei risultati

Dato il rigore della presente prova, un risultato caratterizzato da bassi valori non significa necessariamente che il composto in esame non è biodegradabile nelle condizioni ambientali, ma significa soltanto che occorre necessariamente ulteriore lavoro per stabilire tale caratteristica.

I prodotti chimici che nel corso di questa prova mostrano una elevata rimozione di DOC devono essere considerati come facilmente biodegradabili, purché tale livello sia raggiunto entro 10 giorni a partire dal momento in cui il livello di biodegradazione osservato supera per la prima volta il 10 %.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301 E. Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) Gerike P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determination with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, No. 2, 1979, p. 159—173.

(3) Gerike P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determination with various chemicals in various tests, II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45—55.

Appendice 1

Degradazione biotica: Screening Test OCSE modificato

Istituto: ....

Prodotto esaminato:

Esperimento n.

Dati relativi alla prova

Concentrazione teorica: .... mg/l DOC.

Determinazione del carbonio

	Bottiglia n.		Concentrazione DOC dopo x giorni (mg/l)							
			0 (C_0)							
Prova Soluzione nutritiva minerale con materiale in esame e con inoculo	1	a_1								
		a_2								
		$C_{at} = \frac{a_1 + a_2}{2}$								
	2	b_1								
		b_2								
		$C_{bt} = \frac{b_1 + b_2}{2}$								
Bianco Soluzione nutritiva minerale senza materiale in esame ma con inoculo	3	bl_1								
		bl_2								
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$								

Valutazione dei dati grezzi

Bottiglia n.	Calcolo dei risultati	% eliminazione DOC dopo x giorni							
		0							
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{at} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0							
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{bt} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0							
Media (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0							

(*) D_1 e D_2 non devono essere mediati se fra essi esiste una differenza considerevole.

Degradazione biotica: Metodo OCSE modificato (prova orientativa) (Scheda)

Istituto:

Direttore dello studio:

Data di inizio della prova: .... Esperimento n. ....

Prodotto esaminato:

Struttura chimica:

Soluzione madre:

	mg/l	mg/l TOC (*)	mg/l DOC (**)
Concentrazione del materiale in esame			

(*) Una discordanza fra i valori del DOC e del TOC indica una insufficiente solubilità del materiale.
(**) Tutti i valori del DOC sono stati determinati dopo filtrazione su membrana o centrifugazione.

Analizzatore del carbonio:

Inoculo:

Risultati dell'esperimento

D_t = ... % di rimozione del DOC dopo .... giorni.

Convalida dei risultati

Prodotto chimico di riferimento:

Risultato: .... % di rimozione del DOC dopo .... giorni.

Esperimento di riferimento n.

Osservazioni

(Data) (Firma)

Metodo OCSE modificato
Istituto
Prodotto esaminato
Esperimento n
Rimozione DOC
(%)
Sostanza di riferimento
Sostanza esaminata
Lag
Phase
Time
Window
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
28
30
(giorni)
40

Metodo OCSE modificato (Prova orientativa)
Istituto
Prodotto esaminato
Esperimento n
Rimozione DOC
(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

C. 4. DEGRADAZIONE

DEGRADAZIONE BIOTICA: METODO AFNOR MODIFICATO NF T 90/302

1. METODO

1.1. Introduzione

Il presente metodo è destinato alla misura della biodegradabilità in ambiente acquoso aerobio, dei composti organici idrosolubili non volatili, a una concentrazione iniziale corrispondente a 40 mg/l DOC (carbonio organico disciolto). Qualora i limiti di sensibilità degli apparecchi per l'analisi del carbonio organico dovessero essere migliorati, l'impiego di concentrazioni più basse potrà essere vantaggioso, particolarmente per i composti tossici.

Deve essere determinato il contenuto in carbonio organico del materiale in esame.

Il metodo può essere applicato esclusivamente ai prodotti organici che, alle concentrazioni impiegate per la prova:

— sono solubili in acqua almeno alle concentrazioni da esaminare (40 mg/l di DOC),

— hanno una tensione di vapore trascurabile,

— non esercitano effetti inibitori sui batteri,

— non risultano assorbiti in modo significativo sulle superfici di vetro.

La disponibilità di dati sulle proporzioni relative dei principali componenti del prodotto da esaminare sarà utile per interpretare i risultati ottenuti, particolarmente nei casi in cui i valori trovati sono bassi.

La disponibilità di dati sulla tossicità del prodotto chimico nei confronti dei microorganismi potrà essere utile per l'interpretazione dei risultati bassi.

1.2. Definizioni ed espressione dei risultati

La degradazione si definisce come la rimozione percentuale del DOC rispetto al materiale in esame:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

dove:

D_t = degradazione, come percentuale di rimozione del DOC, al momento t,

C_0 = concentrazione di partenza del DOC nel terreno di coltura (mg/l di DOC),

C_t = concentrazione del DOC nel terreno di coltura al momento t (mg/l di DOC),

$C_{bl(0)}$ = concentrazione di partenza del DOC nel «bianco» (mg/l di DOC),

$C_{bl(t)}$ = concentrazione del DOC nel «bianco» al momento t (mg/l di DOC).

1.3. Sostanze di riferimento

E raccomandabile l'impiego di opportuni prodotti chimici di riferimento per controllare l'attività dell'inoculo.

A questo fine possono essere impiegati ad esempio anilina, acetato di sodio o benzoato di sodio; essi devono mostrare una rimozione del DOC $\geq$ 70 % entro 28 giorni, altrimenti la prova non è considerata valida e deve essere ripetuta impiegando un inoculo di diversa fonte.

In questo specifico metodo di prova, per la prova di inibizione e per il controllo dell'attività dell'inoculo viene impiegato glucosio; tale controllo può anche essere effettuato con anilina, acetato di sodio o benzoato di sodio.

1.4. Principio del metodo

Il metodo è basato sulla biodegradazione ad opera di microorganismi chemiorganotrofi delle sostanze organiche disciolte nell'acqua, impiegata come unica fonte di carbonio e di energia. Dette sostanze sono saggiate ad una concentrazione tale che il contenuto iniziale di carbonio organico sia di 40 mg/l. Il carbonio organico che rimane in soluzione viene misurato almeno dopo 3, 7, 14 e 28 giorni. Contemporaneamente si controllano gli eventuali effetti inibitori della sostanza in esame sull'inoculo. Il procedimento è verificato mediante una sostanza di riferimento.

1.5. Criteri di qualità

La riproducibilità del metodo è stata stabilita nel saggio circolare svolto dall'OCSE e dalla CEE.

La più bassa concentrazione del composto da esaminare per la quale il presente metodo può essere impiegato e determinata in larga misura dal limite di sensibilità dell'apparecchio per il dosaggio del carbonio organico (che attualmente è di 0,5 mg/l di C), nonché dalla concentrazione del carbonio organico disciolto nella soluzione nutritiva.

1.6. Descrizione del metodo

1.6.1. *Reattivi*

Le soluzioni vanno preparate con reagenti puri per analisi (RPA).

1.6.1.1. Acqua distillata

L'acqua distillata non deve contenere carbonio organico in quantità superiore al 10 % di quello introdotto con il materiale da esaminare.

1.6.1.2. Soluzione nutritiva

Preparare il terreno di coltura come indicato più oltre, impiegando prodotti sterili. Per ottenere un litro di soluzione sciogliere in acqua distillata le seguenti sostanze:

$(NH_4)_2SO_4$ (ammonio solfato):	0,300 g RPA
NH_4NO_3 (ammonio nitrato):	0,150 g RPA
KH_2PO_4 (potassio fosfato monobasico):	0,300 g RPA
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (sodio fosfato bibasico dodecaidrato):	2,000 g RPA
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesio solfato eptaidrato):	0,050 g RPA
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (calcio cloruro diidrato)	0,050 g RPA
Estratto di lievito:	0,005 g RPA

Il pH deve essere 7,5 ± 0,1.

Aggiungere 1 ml di una soluzione di oligoelementi aventi la seguente composizione:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (ferro (II) solfato eptaidrato):	0,100 g RPA
$MnSO_4 \cdot H_2O$ (manganese (II) solfato monoidrato):	0,100 g RPA
K_2MoO_4 (potassio molibdato):	0,025 g RPA
$Na_2BO_7 \cdot 10H_2O$ (sodio tetraborato decaidrato):	0,025 g RPA

$CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (rame (II) cloruro diidrato):	0,025 g RPA
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (cobalto (II) nitrato esaidrato):	0,025 g RPA
$ZnCl_2$ (zinco cloruro):	0,025 g RPA
NH_4VO_3 (ammonio vanadiato):	0,010 g RPA

La soluzione di oligoelementi può essere conservata per un mese a temperatura compresa fra +1 e +4 °C.

Portare a volume (1 l) e mescolare. Il terreno deve essere usato entro 12 ore.

1.6.1.3. Sostanze di riferimento

Anilina (distillata prima dell'uso), acetato di sodio, benzoato di sodio, glucosio.

1.6.2. *Apparecchiatura*

Normale apparecchiatura da laboratorio, nonché:

— apparecchio per il dosaggio del carbonio organico,

— spettrofotometro,

— centrifuga a 4000 g,

— agitatore per permettere una adeguata aerazione e agitazione,

— apparecchio per il dosaggio dell'ossigeno disciolto, pH-metro, beute sterili a collo largo da 500 ml,

— apparecchio per la filtrazione sterile (membrane filtranti da 0,22 μm).

La vetreria deve essere ben pulita e completamente esente da qualsiasi traccia di sostanze organiche o tossiche.

1.6.3. *Preparazione dell'inoculo*

Prelevare un volume adeguato di una miscela di tre campioni provenienti da acque superficiali inquinate e da effluenti di impianti municipali di trattamento delle acque fognarie, esenti dai maggiori inquinanti specifici. La carica batterica di ciascun campione deve essere almeno di 10^5 batteri/ml.

I campioni debbono essere impiegati per l'inoculazione entro un periodo di 12 ore, compreso il tempo di trasporto, e non debbono restare privi di aerazione per più di 6 ore.

Filtrare su carta in modo da eliminare le particelle insolubili più grosse; raccogliere il filtrato e farlo passare attraverso una membrana filtrante della porosità di 0,22 μm.

Lavare con una qualsiasi soluzione isotonica. Riprendere i batteri depositati sulla membrana filtrante in un piccolo volume di soluzione isotonica; mescolare bene. Misurare il potere adsorbente a 620 nm e ricavarne la concentrazione dei batteri in base a una curva di riferimento preparata in precedenza mediante una conta sul terreno solido di *Pseudomonas fluorescens* del ceppo ATCC 15453. Aggiungere il volume di soluzione necessario per portare la concentrazione dei batteri a $5 \pm 3 \times 10^7$ batteri/ml. Utilizzare l'inoculo entro un'ora.

1.6.4. *Procedimento*

L'incubazione deve essere effettuata al riparo dalla luce intensa, in un incubatore mantenuto a 20—25 °C ed esente da vapori tossici.

Preparare le seguenti soluzioni:

1. Sciogliere una quantità della sostanza da esaminare pari a 40 mg/l di carbonio organico, nel terreno di coltura (1.6.1.2).

2. Sciogliere una quantità di glucosio, pari a 40 mg/l di carbonio organico, nel terreno di coltura (1.6.1.2).

3. Soluzione nel terreno di coltura (1.6.1.2) contenente la sostanza da esaminare e il glucosio alle concentrazioni impiegate.

4. Un adeguato volume di terreno di coltura (1.6.1.2).

Mescolare singolarmente le quattro soluzioni e sterilizzare su membrana filtrante da 0,22 μm.

Le membrane filtranti sono adatte soltanto se non cedono carbonio e non assorbono la sostanza in fase di filtrazione.

Tutte le manipolazioni necessarie devono essere effettuate secondo tecniche sterili. Ripartire le soluzioni in più recipienti di prova (previamente sterilizzati), secondo il seguente schema:

Beuta n. 1 (prova):	150 ml della soluzione 1
Beuta n. 2 (prova):	150 ml della soluzione 1
Beuta n. 3 (prova):	150 ml della soluzione 1
Beuta n. 4 (controllo sterile):	150 ml della soluzione 1
Beuta n. 5 (controllo glucosio):	150 ml della soluzione 2
Beute n. 6 (controllo dell'azione inibitrice):	150 ml della soluzione 3
Beuta n. 7:	150 ml della soluzione 4

Inoculare le beute 1, 2, 3, 5, 6 e 7 con 1,5 ml di inoculo e mescolare bene agitando manualmente.

Prelevare da ciascuna beuta un'aliquota di 3—5 ml.

Centrifugare le aliquote a 4 000 g per 15 minuti, mantenendo la temperatura al di sotto di 26 °C.

Raccogliere i surnatanti per il dosaggio del carbonio organico al tempo zero.

Porre le beute nell'agitatore e lasciarvele per tutto il periodo dell'esperimento: la concentrazione dell'ossigeno disciolto al terzo giorno nella beuta 5 deve essere almeno di 5 mg/l.

Allo stesso modo descritto per il dosaggio del carbonio organico al tempo zero, effettuare questa prova sulle beute 1, 2, 3, 5, 6 e 7, dopo almeno 3, 7, 14 e 28 giorni di incubazione. Tuttavia, se nelle beute 1, 2 e 3 la diminuzione del contenuto di carbonio raggiunge il 95 % del contenuto iniziale, la prova deve essere considerata ultimata.

Alla fine della prova, dosare il carbonio organico contenuto nel recipiente 4 allo stesso modo indicato per il tempo zero, e controllare la sterilità, insemenzando in una provetta di terreno liquido di coltura e tenendo in incubazione a 25 °C per 5 giorni.

Terreno di coltura:

— estratto di lievito disidratato:	3 g
— peptone pancreatico-caseina:	6 g
— acqua:	1 000 ml

Sciogliere i componenti del terreno completo disidratato in acqua bollente. Se necessario, regolare il pH in modo che dopo sterilizzazione esso sia di 7,2 ± 0,2 a 20 °C.

Se il dosaggio del contenuto di carbonio organico deve essere rinviato, conservare il surnatante a 4 °C in recipienti di vetro ermeticamente chiusi e al buio; la massima durata di conservazione accettabile è di

24 ore. Se l'analisi non può essere effettuata entro le 24 ore, congelare a temperatura inferiore a − 18 °C.

Per compensare le perdite d'acqua dovute all'evaporazione, prima di ciascun campionamento verificare il volume del liquido contenuto nel recipiente e, se necessario, integrarlo con acqua distillata sterilizzata per filtrazione attraverso membrana filtrante da 0,22 µm, in modo da ripristinare il volume misurato dopo il precedente prelevamento.

2. DATI E VALUTAZIONI

I risultati analitici devono essere registrati sulla scheda allegata (appendice 1) e i valori della biodegradazione devono essere calcolati come descritto al punto 1.2. I risultati della degradazione si considerano validi se sono rispettate le seguenti condizioni:

— la degradazione del glucosio nella beuta 5 deve essere almeno dell'80 % al settimo giorno;

— alla fine della prova, la beuta 4 deve risultare ancora sterile;

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto al terzo giorno nella beuta 5 deve essere almeno di 5 mg/l.

Il livello della biodegradazione del glucosio nella beuta 6 al settimo giorno deve essere uguale almeno al 75 % di quello osservato nella beuta 5. Se tale limite non è raggiunto, si può ammettere che la sostanza sottoposta alla prova abbia effetto inbitorio sui batteri presenti, e che pertanto alla concentrazione indicata il metodo non è applicabile.

Nota

Il confronto della rimozione percentuale del carbonio fra i recipienti 1, 2 e 3 e il recipiente 4 permette di differenziare le cause della degradazione osservata:

— nella beuta 4, la degradazione è dovuta al meccanismo chimico-fisico;

— nelle beute 1, 2 e 3 la degradazione è dovuta ai meccanismi chimico-fisico e biologico.

3. RELAZIONE

3.1. Resoconto della prova

Devono essere riferiti tutti i risultati sperimentali concernenti la sostanza esaminata, la sostanza di riferimento e i «bianchi».

Vanno menzionati in particolare i seguenti punti:

— misura della scomparsa del prodotto nella beuta 4 alla fine della prova;

— eventuali fenomeni di inibizione osservati;

— convalida;

— l'andamento del saggio di degradazione è rappresentato graficamente in un diagramma che mostra la fase latente, la fase di degradazione, la pendenza e il «time window» («time window» indica qui un periodo di 10 giorni, che inizia dal giorno in cui il livello osservato di biodegradazione supera per la prima volta il 10 %).

3.2. Interpretazione dei risultati

Dato il rigore della presente prova, un risultato caratterizzato da bassi valori non significa necessariamente che il composto in esame non è biodegradabile nelle condizioni ambientali, ma significa soltanto che occorre necessariamente più lavoro per stabilire tale caratteristica. I prodotti chimici per i quali la presente prova dà un valore elvato della perdita di DOC possono essere considerati facilmente biodegradabili, purché tale livello venga raggiunto entro 10 giorno a partire dal momento in cui il livello di biodegradazione osservato supera per la prima volta il 10 %.

4. BIBLIOGRAFIA

(1) OECD, Paris, 1981, Test guideline 301A. Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) Gerike, P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159—173.

(3) Gerike, P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45—55.

(4) AFNOR: Method for the evaluation in aqueous medium of the biodegradability of so-called « total » of organic products. T 90—302.

Appendice 1

Metodo AFNOR NF T 90/302 modificato (Scheda)

Esperimento n.

Data di inizio della prova:

Materiale sotto prova di controllo:

Concentrazione teorica di prova:

Valori analitici del carbonio:

Determinazione del carbonio

Culture Medium	Numero beuta	DOC — Concentrazione dopo x giorni (mg/l)				
		t = 0	3	7	14	28
Prova	1	$^{1}C_{0}$	$^{1}C_{3}$	$^{1}C_{7}$	$^{1}C_{14}$	$^{1}C_{28}$
Prova	2	$^{2}C_{0}$	$^{2}C_{3}$	$^{2}C_{7}$	$^{2}C_{14}$	$^{2}C_{28}$
Prova	3	$^{3}C_{0}$	$^{3}C_{3}$	$^{3}C_{7}$	$^{3}C_{14}$	$^{3}C_{28}$
Media	1 — 3	$\bar{C}_{0}$	$\bar{C}_{3}$	$\bar{C}_{7}$	$\bar{C}_{14}$	$\bar{C}_{28}$
Riferimento sterile	4	$^{4}C_{0}$	X	X	X	$^{4}C_{28}$
Riferimento glucosio	5	$^{5}C_{0}$	$^{5}C_{3}$	$^{5}C_{7}$	$^{5}C_{14}$	$^{5}C_{28}$
Riferimento inibizione	6	$^{6}C_{0}$	$^{6}C_{3}$	$^{6}C_{7}$	$^{6}C_{14}$	$^{6}C_{28}$
Riferimento inoculo	7	$C_{bl(0)}$	$C_{bl(3)}$	$C_{bl(7)}$	$C_{bl(14)}$	$C_{bl(28)}$

Valutazione dei risultati

	t = 0	3	7	24	28 (giorni)
Prova $\left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Glucosio $\left[1 - \frac{^{5}C_t - C_{bl(t)}}{^{5}C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				
Controllo inhibizione $\left[1 - \frac{^{6}C_t - C_{bl(t)}}{^{6}C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$	0				

Validità:

— beuta 5: Ossigeno disciolto al terzo giorno: .... mg/l

— beuta 5: % biodegradazione al settimo giorno: %

— beuta 6: % biodegradazione al settimo giorno: %

— beuta 4: Sterilità:

Appendice 2
Metodo AFNOR NF T 90/302 modificato
Istituto . . .
Prodotto esaminato
Esperimento n
Rimozione DOC
(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
28
30
(giorni) 40
Sostanza di riferimento
Sostanza esaminata
Lag
Phase
Time
Window

Metodo AFNOR NF T 90/302 modificato

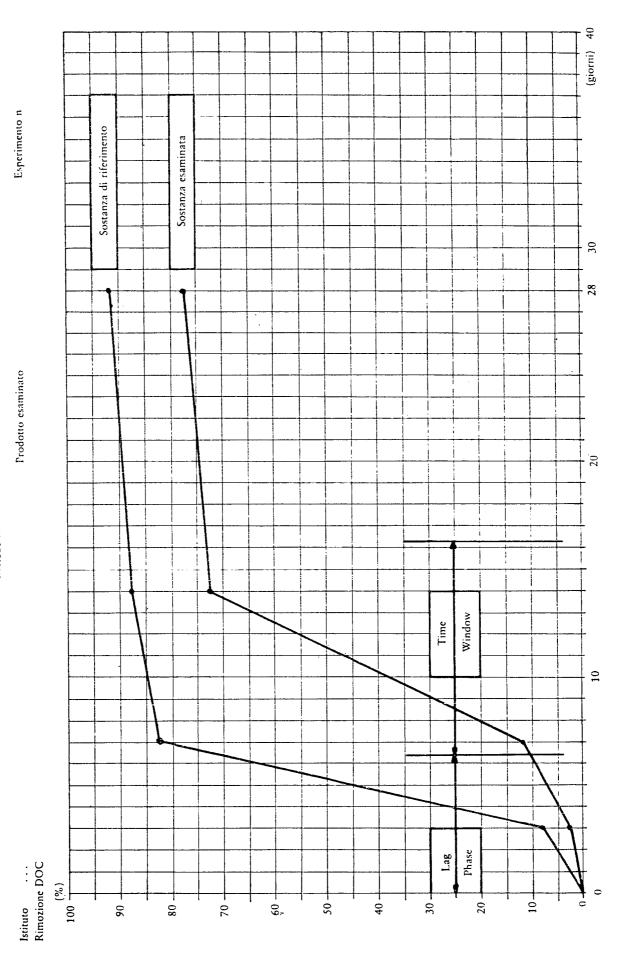
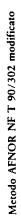
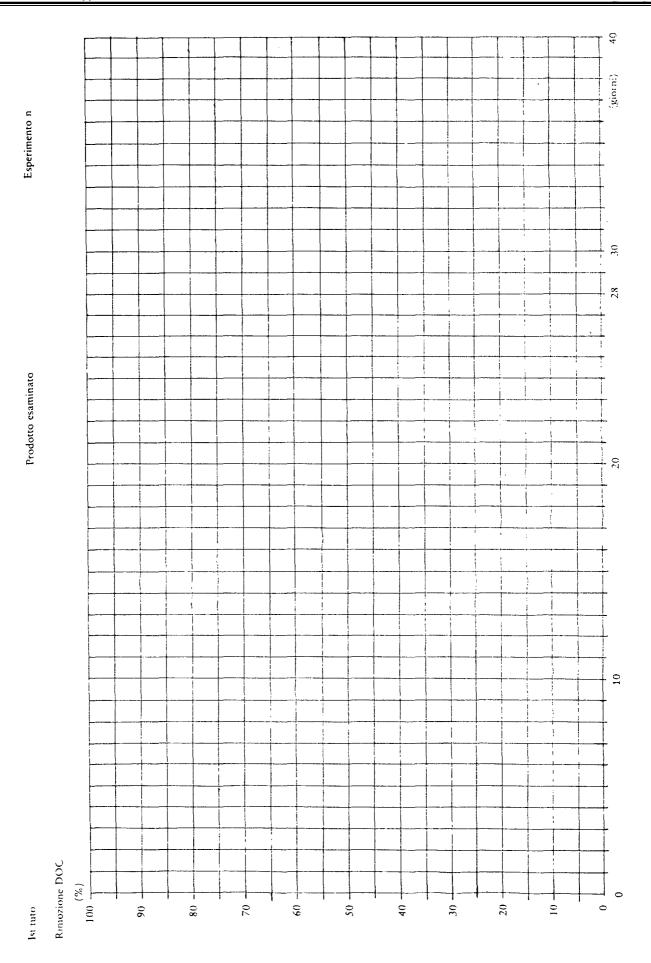
Istituto

Prodotto esaminato

Esperimento n

Rimozione DOC (%)

100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

0 10 20 28 30 40 (giorni)

C. 5. DEGRADAZIONE

DEGRADAZIONE BIOTICA: METODO DI STURM MODIFICATO

1. METODO

1.1. Introduzione

Il presente metodo è destinato alla misurazione della biodegradabilità in ambiente acquoso aerobio delle sostanze organiche non volatili, alle due concentrazioni iniziali di 10 e 20 mg/l (concentrazioni standard).

La quantità di carbonio organico presente nel prodotto da esaminare deve essere nota (determinazione del carbonio organico totale o sua valutazione, in base alla formula empirica), per consentire il calcolo del rendimento teorico in CO_2.

Il metodo può essere applicato esclusivamente ai prodotti organici che, alla concentrazione impiegata per l'esperimento:

— hanno una tensione di vapore trascurabile;

— non esercitano effetti inibitori sui batteri.

Il presente metodo, almeno in linea di principio, può essere applicato alle sostanze scarsamente solubili alle concentrazioni sperimentali.

La disponibilità di dati sulle proporzioni relative dei principali componenti del prodotto da esaminare sarà utile per interpretare i risultati ottenuti, particolarmente nei casi in cui i valori trovati sono bassi.

La disponibilità di dati sulla tossicità del composto nei confronti dei microorganismi potrà essere utile per l'interpretazione degli eventuali valori bassi e per la scelta delle concentrazioni sperimentali più opportune.

1.2. Definizioni ed espressione dei risultati

La degradazione si definisce come la quantità di CO_2 prodotta dalla sostanza espressa come percentuale rispetto alla CO_2 teorica che essa avrebbe dovuto produrre ($ThCO_2$), calcolata in base al contenuto di carbonio organico della sostanza.

1.3. Sostanze di riferimento

È raccomandabile l'impiego di un opportuno prodotto chimico di riferimento per controllare l'attività dell'inoculo. A questo fine possono essere impiegati, ad esempio, anilina, acetato di sodio o benzoato di sodio; essi devono dare luogo ad uno sviluppo di CO_2 uguale o superiore al 60 % entro 28 giorni, altrimenti la prova non è considerata valida impiegando un inoculo di diversa fonte.

1.4. Principio del metodo

Il prodotto in esame viene aggiunto a un terreno liquido chimicamente definito, inoculato con microorganismi provenienti da uno scario e aerato alla temperatura di 20—25 °C. La temperatura viene registrata durante il periodo di durata della prova.

La CO_2 sviluppatasi viene captata come $BaCO_3$ e la degradazione viene seguita attraverso il dosaggio di CO_2 per la durata di 28 giorni. Previo riferimento di opportuni «bianchi», si determina la quantità

totale di CO_2 liberata dal prodotto in esame durante il periodo di prova e si calcola la percentuale che essa rappresenta rispetto alla CO_2 totale che il materiale in esame avrebbe dovuto teoricamente produrre in base al suo contenuto di carbonio organico.

Il procedimento viene controllato mediante una sostanza di riferimento (vedi punto 1.6.1.3).

1.5. **Criteri di qualità**

La riproducibilità del metodo è stata stabilita nel saggio circolare svolto dall'OCSE e dalla CEE.

La produzione endogena di CO_2 dell'inoculo, misurata nel recipiente del «bianco» rappresenta il motivo principale per cui la sostanza in esame non si può impiegare a una concentrazione inferiore ai 5 mg/l.

Quando la prova è adattata ad una sostanza marcata con ^{14}C, la concentrazione può essere molto più bassa.

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. *Reattivi*

1.6.1.1. Acqua di elevata qualità rispondente alle seguenti specifiche

Acqua bidistillata, esente da sostanze tossiche (in particolare da rame), a basso contenuto di carbonio (< 2,0 mg/l TOC), con resistività ⩾ 18 megaohms/cm. L'acqua distillata non deve contenere più del 10 % del carbonio organico introdotto con il prodotto da esaminare.

1.6.1.2. Soluzione nutritiva

a) Soluzioni madre

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (ferro (III) cloruro esaidrato): 0,25 g

Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesio solfato eptaidrato): 22,50 g

Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).

$CaCl_2$ (calcio cloruro): 27,50 g

Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).

KH_2PO_4 (potassio fosfato monobasico): 8,50 g

K_2HPO_4 (potassio fosfato bibasico): 21,75 g

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (sodio fosfato bibasico biidrato): 33,40 g

NH_4Cl (ammonio cloruro): 1,70 g

Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).

$(NH_4)_2SO_4$ (ammonio solfato): 40,00 g

Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).

b) Terreno di coltura per la prova

Per ogni litro di acqua (1.6.1.1) devono essere aggiunti i reattivi che seguono:

— 4 ml della soluzione di cloruro ferrico sopra indicata;

— 1 ml della soluzione di solfato di magnesio sopra indicata;

— 1 ml della soluzione di cloruro di calcio sopra indicata;

— 2 ml della soluzione di fosfati sopra indicata;

— 1 ml della soluzione di solfato di ammonio sopra indicata.

Il pH deve essere di 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Sostanze di riferimento

Anilina (distillata prima dell'uso), acetato di sodio, benzoato di sodio.

1.6.1.4. Idrossido di bario 0,025 N (0,0125 M)

Sciogliere 4,0 g di $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ in un litro di acqua (1.6.1.1). Filtrare su carta e chiudere ermeticamente il recipiente contenente la soluzione limpida, per evitare l'assorbimento di CO_2 dall'aria. Per i lavori in serie è opportuno preparare più di 5 l per volta.

1.6.2. *Apparecchiature*

1.6.2.1. Apparecchio per il lavaggio di CO_2

L'apparecchiatura indicata è prevista per una serie di 12 bottiglie di vetro scuro (3 prodotti da esaminare), del contenuto di 4—5 l; qualora si impieghino recipienti di vetro chiaro, la prova deve essere effettuata al buio.

Quattro bottiglie di plastica da 1 l, contenenti 700 ml di NaOH 10 N (10 M).

Una beuta da 1 l, contenente 700 ml di soluzione di $Ba(OH)_2$ 0,025 N (0,0125 M).

Una beuta vuota da 1 l, per impedire il risucchio del liquido. Queste bottiglie devono essere collegate in serie a una fonte di aria compressa, mediante tubazioni in materiale inerte, l'aria deve passare attraverso le soluzioni di lavaggio a velocità costante. Per ogni ulteriore serie di 4 bottiglie, aggiungere una bottiglia di plastica da 1 l contenente 700 ml di NaOH 10 N (10 M).

1.6.2.2. Apparecchiatura per la produzione di CO_2

Per ciascun prodotto da esaminare 4 bottiglie in vetro scuro della capacità di 4—5 l.

Tappi, tubi flessibili, tubi in plastica.

1.6.2.3. Bottiglie assorbenti di CO_2

Bottiglie assorbenti da 100 ml per idrossido di bario.

1.6.3. *Preparazione dell'inoculo*

Quale fonte di microorganismi per la sperimentazione si impiega un fango attivato prelevato prima della prova da un impianto municipale validamente funzionante per il trattamento delle acque fognarie. L'afflusso di effluenti industriali in tale impianto deve essere minimo o assente.

All'arrivo in laboratorio, il fango attivo deve essere aerato per 4 ore. Si preleva poi un campione da 500 ml del liquido misto e lo si omogenizza per due minuti a velocità media con un agitatore meccanico. Si lascia poi riposare per mezz'ora.

Se dopo 30 minuti il surnatante contiene ancora una elevata percentuale di solidi sospesi, esso può essere lasciato riposare per altri 30—60 minuti, ovvere essere adattato alle condizioni del laboratorio per migliorarne la sedimentazione.

Si decanta il surnatante, facendo in modo da disporre di un volume sufficiente per poter aggiungere l'1 % di inoculo in ciascuno dei recipienti per la CO_2. Evitare il sifonamento dei solidi sospesi, che interferirebbero nella misura della produzione di CO_2.

E facoltativo ma utile effettuare una conta dei batteri sul surnatante per determinarne la carica batterica.

Questo inoculo dovrebbe normalmente contenere da 10^6 a 20×10^6 unità formatrici di colonie (UFC) per ml.

L'inoculo va impiegato lo stesso giorno della preparazione.

1.6.4. *Modo di operare*

1.6.4.1. Soluzione madre

Si prepara una soluzione madre iniziale della sostanza da esaminare, sciogliendola in acqua distillata (1.6.1.1), in modo da ottenere una concentrazione di 1 000 mg/l.

Le soluzioni madre sono portate al volume necessario sulla base del carbonio organico contenuto nella sostanza in esame. Se questo non è noto, le soluzioni madre devono essere portate all'opportuna concentrazione sulla base del peso. Per ottenere un campione omogeneo è necessario mescolare bene, evitando contemporaneamente la formazione di schiuma che potrebbe concentrare la sostanza in esame.

Per i campioni solidi può essere necessario fondere e agitare l'intero contenuto della bottiglia campione prima di prelevarne un'aliquota. Questa parte del procedimento è estremamente importante, in quanto il calcolo della biodegradazione percentuale dipende dalla presenza della quantità esatta di carbonio nel sistema di prova.

Il pH della soluzione madre non deve essere aggiustato, a meno che esso non cada al di fuori del campo di pH 3—10, poiché il fosfato contenuto nel terreno eserciterà un'azione tamponante. Se il pH eccede i suddetti valori, portare un'aliquota della soluzione madre a pH 7,0 (± 1,0) mediante HCl o NaOH 1 N (1 M), avendo cura di rimescolare energicamente la soluzione durante l'aggiunta dell'acido o della base.

Per confermare la concentrazione nominale del carbonio organico nel composto in esame, si può procedere alla determinazione del carbonio organico totale sulla soluzione madre preparata (o sull'aliquota neutralizzata).

L'analisi del carbonio organico totale è necessaria anche per la soluzione madre di riferimento.

Se il prodotto da esaminare è insolubile in acqua, aggiungere una opportuna quantità, in peso o in volume, direttamente nella bottiglia dell'analisi.

Se il materiale da esaminare non è solubile alla concentrazione adottata per la prova, per ottenere una buona dispersione del materiale stesso, vanno adottate misure particolari, quali la dispersione per ultrasuoni o altri metodi opportuni.

1.6.4.2. Condizioni

Poiché nella prova per la CO_2 viene impiegato l'1 % di inoculo, è necessario effettuare delle diluizioni nel terreno di prova per la CO_2.

La maniera più facile è la seguente:

a) in ciascuna delle bottiglie da 4—5 l aggiungere 2 470 ml di acqua (1.6.1.1);

b) in ognuna delle bottiglie da 4—5 l, aggiungere 3 ml delle soluzioni di solfato ammonico, solfato di magnesio e cloruro di calcio, nonché 6 ml della soluzione tampone al fosfato e 12 ml della soluzione di cloruro ferrico;

c) in ciascuna delle bottiglie da 4—5 l aggiungere 30 ml dell'inoculo preparato a partire dal fango attivo;

Per liberare tale miscela dall'anidride carbonica, aerare per 24 ore con aria esente da CO_2.

Dopo il periodo di aerazione, riempire 3 bottiglie di assorbimento di CO_2 con 100 ml di $Ba(OH)_2$, 0,025 N (0,0125 M) e collegarle in serie all'uscita dell'aria di ciascun recipiente.

1.6.4.3. Esecuzione della prova

La prova inizia al momento in cui la sostanza in esame viene aggiunta in 2 delle 4 bottiglie. Ciascuna sostanza viene esaminata a 2 concentrazioni (10 e 20 mg/l). La quantità di soluzione madre del prodotto da esaminare da introdurre nella bottiglia, si calcola come segue:

$$\text{ml di soluzione madre per bottiglia} = \frac{B \times C}{A}$$

dove:

B = concentrazione della sostanza in esame nella bottiglia di prova (mg/l);

A = concentrazione della sostanza in esame nella soluzione madre (mg/l);

C = volume finale di soluzione nella bottiglia (ml).

Nelle appropriate bottiglie aggiungere soluzione madre in quantità sufficiente per ottenere la concentrazione desiderata, calcolata come sopra indicata, più acqua distillata fino a 473 ml di volume totale (soluzione madre + acqua [1.6.1.1]). Nella terza bottiglia, usata come «bianco» e non contenente prodotto da esaminare, aggiungere 473 ml di acqua (1.6.1.1).

Il volume finale contenuto in ciascuna bottiglia deve essere di 3 000 ml.

Aggiungere all'ultima delle 4 bottiglie una sostanza di riferimento, in modo da ottenere una concentrazione di 20 mg/l.

La prova inizia facendo gorgogliare attraverso la soluzione aria esente da CO_2, alla portata di 50—100 ml/minuto (1—2 bolle/secondo).

Per gli eventuali prodotti insolubili, aggiunti alla stato secco nella bottiglia, si può provvedere all'agitazione con un agitatore meccanico. Per i prodotti che formano schiuma, il gorgogliamento di aria esente da CO_2 può essere sostituito dall'aerazione nello spazio superiore e dall'agitazione magnetica.

La quantità di CO_2 prodotta in ciascuna bottiglia reagisce con l'idrossido di bario e precipita sotto forma di carbonato di bario; la quantità di CO_2 si determina retrotitolando $Ba(OH)_2$ con HCl 0,05 N (0,05 M).

Periodicamente (ogni 2 o 3 giorni), staccare per la titolazione l'assorbitore di CO_2 più vicino al recipiente. Avvicinare di un posto al recipiente gli altri due assorbitori e porre all'estremità della serie un nuovo assorbitore contenente 100 ml di soluzione fresca di $Ba(OH)_2$ 0,025 N (0,0125 M).

Le titolazioni vanno effettuate secondo necessità (prima della formazione evidente di $BaCO_3$ nel secondo assorbitore), in genere a giorni alterni per i primi dieci giorni ed ogni 5 fino al ventottesimo giorno.

Al ventisettesimo giorno misurare nuovamente il pH del contenuto della bottiglia, poi aggiungere 1 ml di HCl concentrato in ognuna delle 2 bottiglie di prova, per eliminare i carbonati inorganici. Aerare i recipienti per una notte e prelevare da ciascuno di essi gli opportuni campioni per la determinazione del DOC. La titolazione finale va effettuata il ventottesimo giorno.

Le titolazione su 100 ml di $Ba(OH)_2$ vanno effettuate dopo aver staccato le bottiglie più prossime alle bottiglie di prova. Per la titolazione del $Ba(OH)_2$ va impiegato HCL 0,05 N (0,05 M) (indicatore: fenolftaleina).

La prova va effettuata a temperatura ambiente (20—25 °C); durante tutto il periodo di prova, la temperatura va registrata.

Se prima del diciottesimo giorno si ottiene un valore costante, la prova si può ritenere conclusa.

Se al ventottesimo giorno la degradazione è chiaramente iniziata, ma non ha ancora raggiunto un valore costante, e buona norma prolungare l'esperimento di 1—2 settimane.

1.6.5 *Determinazione di CO_2*

Per la determinazione della quantità di CO_2 sviluppata, possono essere presi in considerazione metodi diversi dalla retrotitolazione del contenuto degli assorbitori a $Ba(OH)_2$. Ciò non cambia il principio della prova, anzi potrebbe eventualmente permettere la lettura continua della biodegradazione mentre essa è in corso.

La prima fase per il calcolo della quantità di CO_2 prodotta consiste nell'apportare ai valori riscontrati nelle bottiglie contenenti il prodotto da esaminare, una correzione che tenga conto della produzione endogena di CO_2. La bottiglia di controllo serve da «bianco dell'inoculo», per apportare la correzione resa necessaria dallo sviluppo di Co_2 dovuto alla respirazione endogena dei batteri. La quantità di CO_2 prodotta da una sostanza in esame viene determinata attraverso la differenza fra 1 ml di reattivo impiegato per titolare il contenuto degli assorbitori a $Ba(OH)_2$ collegati rispettivamente al recipiente sperimentale e a quello del bianco.

Se per la titolazione del contenuto della bottiglia di assorbimento si impiega HCl 0,05 N (0,05 M), ciascun ml di HCl titolato corrisponde a 1,1 mg di CO_2 prodotta.

2. DATI E VALUTAZIONI

I risultati analitici vanno registrati sull'allegata scheda (vedi appendice 1) e i valori della biodegradazione vanno calcolati come indicato al punto 1.2.

Le concentrazioni di CO_2 devono essere calcolate con l'approssimazione di 0,1 mg/l. I valori della biodegradazione devono essere arrotondati all'unità percentuale più vicina. Il corso della degradazioni deve essere seguito su un grafico, come mostrato nell'annesso esempio (vedi appendice 2).

I risultati della prova di degradazione si considerano validi se sono soddisfatte le seguenti condizioni:

— nella stessa serie di determinazioni, il prodotto di riferimento deve dare una biodegradazione uguale o superiore al 60 % entro 28 giorni. In caso contrario, l'intera serie deve essere scartata e la sperimentazione deve essere ripetuta con un inoculo di altra fonte;

— durante la prova, nel recipiente del «bianco» non deve essersi avuto uno sviluppo significativo di CO_2 (indizio di contaminazione del terreno, della vetreria e dell'aria). Lo sviluppo totale di CO_2 non può superare 50 mg di CO_2 per tre litri di soluzione.

3. **RELAZIONE**

3.1. **Resoconto della prova**

Devono essere indicati, se possibile:

— i dati previsti dall'acclusa scheda (vedi appendice 1);

— l'andamento del saggio di degradazione è rappresentato graficamente in un diagramma che mostra la fase latente, la fase di degradazione, la pendenza e il «Time window» («Time window» indica qui un periodo di 10 giorni, che inizia dal giorno in cui il livello osservato di biodegradazione supera per la prima volta il 10 %);

— i procedimenti di dispersione adottati per le sostanze insolubili nelle condizioni sperimentali;

— la data e il luogo del prelevamento dei microorganismi e il modo in cui essi sono stati trattati prima dell'inoculazione;

— l'intervallo di temperatura registrato durante il periodo di prova;

— qualora si sia proceduto alla sua misurazione secondo i suggerimenti al punto 1.6.2 (inoculazione), il numero di microorganismi per ml (UFC/ml) (UFC = unità formatrici di colonie);

— la convalida della prova (degradazione $\geqslant$ 60 % della sostanza di riferimento in 28 giorni).

3.2. **Interpretazione dei risultati**

Dato il rigore della prova, un risultato caratterizzato da bassi valori non significa necessariamente che il composto non e biodegradabile nelle condizioni ambientali, ma significa soltanto che occorre necessariamente piu lavoro per stabilire tale caratteristica.

I prodotti che hanno mostrato un grado elevato di biodegradazione in questa prova devono essere considerati facilmente biodegradabili, purché tale livello venga raggiunto entro 10 giorni a partire dal momento in cui il livello di biodegradazione osservato supera per la prima volta il 10 %.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301 B. Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) Gerike P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determination with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159—173.

(3) Gerike P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determination with various chemicals in various tests, II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45—55.

(4) Larson R. J., Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 38, 1979, p. 1153—1161.

———

Appendice 1

Schema per il metodo di Sturm modificato

Esperimento n. ....

Data di inizio della prova:

Prodotto sotto esame/di riferimento:

Concentrazione teorica/sperimentale:

Analisi del carbonio:

$ThCO_2$ teorico:

Intervallo di temperatura durante la prova:

Produzione di CO_2:

Giorni	CO_2 trovata	CO_2 cumulativa	% $ThCO_2$
28			

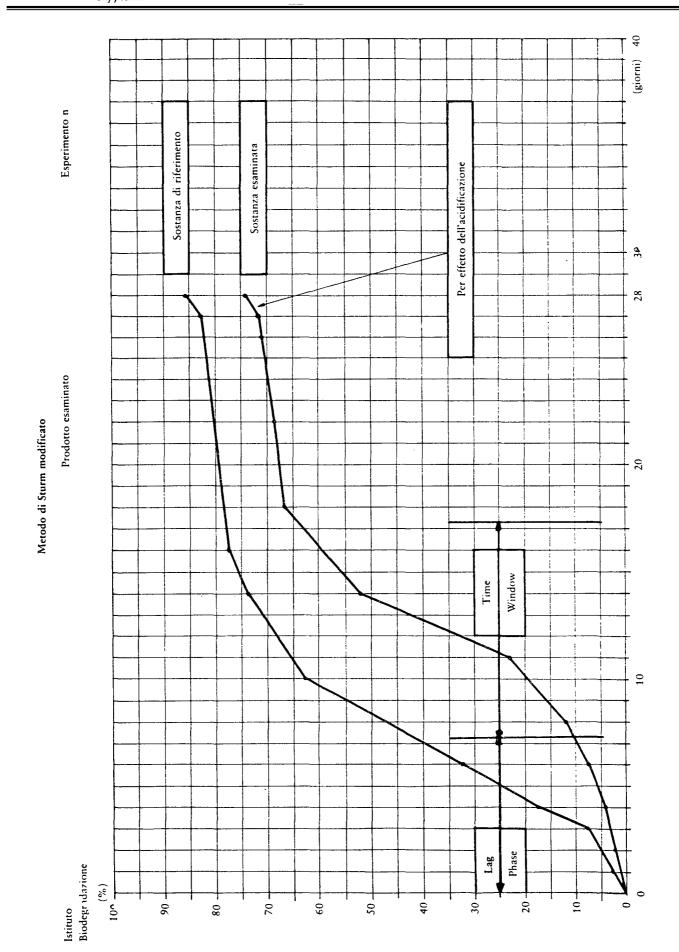
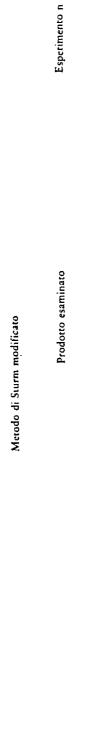
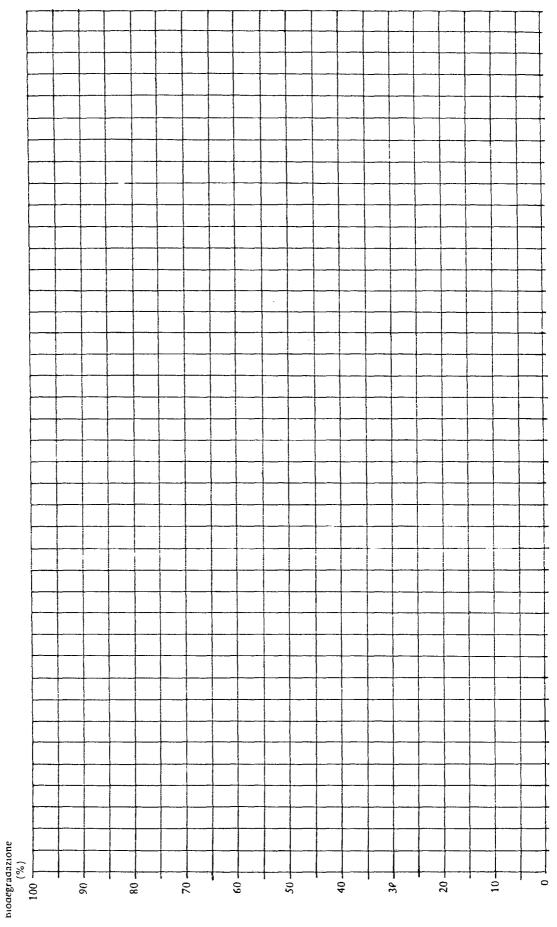
Validità:

— percentuale di biodegradazione del prodotto di riferimento

— sviluppo totale di CO_2 nel recipiente del «bianco»

Istituto

Biodegradazione (%)

100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

C. 6. DEGRADAZIONE

DEGRADAZIONE BIOTICA: METODO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA

1. METODO

1.1. Introduzione

Il metodo è destinato alla misura della biodegradabilità dei composti organici in un ambiente acquoso aerobio, ad una concentrazione sperimentale compresa fra 2 (concentrazione standard) e 10 mg/l di sostanza da esaminare.

Nella sua forma attuale, questo metodo si presta particolarmente alla valutazione della biodegradabilità dei composti idrosolubili; almeno in linea di principio, esso dovrebbe permettere di esaminare anche i composti volatili e quelli scarsamente solubili.

Per poter calcolare la richiesta teorica di ossigeno (ThOD) è necessario conoscere la formula empirica del materiale in esame; qualora essa non sia nota, la richiesta chimica di ossigeno (COD) del materiale stesso puo servire come valore di riferimento (vedi appendice 1).

Il metodo è applicabile soltanto ai prodotti organici che alla concentrazione sperimentale non esercitano azione inibitrice sui batteri.

Se a detta concentrazione il materiale da esaminare non è solubile, per assicurarne una buona dispersione, si può ricorrere a metodi speciali, come ad esempio la dispersione mediante ultrasuoni.

Per interpretare i risultati ottenuti, particolarmente nei casi in cui i valori trovati sono bassi, sarà utile disporre di dati sulle proporzioni relative ai principali componenti della sostanza in esame.

La disponibilità di dati sulla tossicità del prodotto in esame nei confronti dei microorganismi potrà essere utile per l'interpretazione di eventuali bassi valori e per la scelta delle concentrazioni sperimentali appropriate.

Questo metodo può essere impiegato per determinare il BOD.

1.2. Definizione ed espressione dei risultati

La richiesta biochimica di ossigeno (BOD) si calcola come differenza fra le quantità di ossigeno che vengono consumate, nelle condizioni sperimentali, da un «bianco» e da una soluzione della sostanza da esaminare. Dividendo tale differenza per la concentrazione (P/V) della sostanza, si ottiene la quantità netta di ossigeno consumata, espressa in mg BOD/mg di sostanza.

La degradazione si definisce come rapporto fra la richiesta biochimica di ossigeno e la richiesta teorica di ossigeno (ThOD) o la richiesta chimica di ossigeno (COD) e viene espressa in percentuale.

Osservazioni: può avvenire che i due metodi di calcolo (% del ThOD o % del COD) non diano lo stesso risultato.

$$\%\ \text{biodegradazione (ThOD)} = \frac{\text{mg } O_2/\text{mg di sostanza esaminata}}{\text{ThOD}} \times 100$$

oppure

$$\%\ \text{biodegradazione (COD)} = \frac{\text{mg } O_2/\text{mg di sostanza esaminata}}{\text{mg COD/mg sostanza esaminata}} \times 100$$

dove:

ThOD = richiesta teorica di ossigeno (per il calcolo vedi appendice 1),

COD = richiesta chimica di ossigeno determinata sperimentalmente.

1.3. **Sostanze di riferimento**

E auspicabile l'impiego di opportuni prodotti chimici per controllare l'efficienza dell'inoculo.

A questo fine possono essere impiegati, ad esempio, anilina, acetato di sodio o benzoato di sodio. Essi devono mostrare una degradazione uguale o superiore al 60 % entro 28 giorni; in caso contrario, la prova non e considerata valida e deve essere ripetuta impiegando un inoculo di altra fonte.

1.4. **Principio del metodo**

Una quantità prestabilita del composto viene disciolta in un terreno inorganico (soluzione nutritiva minerale), ad una concentrazione che di solito è uguale a 2 mg/l di sostanza in esame. La soluzione viene inoculata con un piccolo numero di microorganismi provenienti da una popolazione mista e conservata in bottiglie, al buio, in un bagno termostatico o al chiuso a 20—21 °C.

La degradazione è seguita da dosaggi dell'ossigeno, effettuati durante un periodo di 28 giorni. Il procedimento è verificato inoculando una sostanza di riferimento.

Deve essere effettuata in parallelo una prova in bianco per l'ossigeno, senza aggiunta della sostanza in esame o di prodotti di riferimento.

Contemporaneamente, la sostanza in esame deve essere controllata per verificarne i possibili effetti inibitori sull'inoculo.

1.5. **Criteri di qualità**

La riproducibilità del metodo è stata stabilità nel saggio circolare svolto dall'OCSE e dalla CEE.

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. *Reattivi*

1.6.1.1. Acqua distillata o deionizzata

Acqua distillata o deionizzata contenente Cu non oltre 0,01 mg/l, saturata di aria. Un opportuno volume, adeguato alle esigenze di una giornata (ad esempio 50 l) e mantenuto a temperatura ambiente (quanto più vicino possibile a 20 °C), viene aerata vigorosamente per 20 minuti con aria compressa pulita. Generalmente l'acqua è pronta per l'impiego dopo essere stata mantenuta per 20 ore a 20 °C. Per controllo si determina la quantità di ossigeno disciolta, la cui concentrazione a 20 °C deve essere di 9,09 mg/l di O_2. Tutte le operazioni di travaso e di riempimento con l'acqua saturata d'aria devono essere effettuate mediante un sifone, evitando la formazione di bolle.

1.6.1.2. Soluzione nutritiva

a) Soluzioni madre:

KH_2PO_4 (potassio fosfato monobasico):	8,50 g
K_2HPO_4 (potassio fosfato bibasico):	21,75 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (sodio fosfato bibasico diidrato):	33,30 g
NH_4Cl (ammonio cloruro)	1,70 g

Scogliere e portare a 1 000 ml con acqua distillata.

Il pH deve essere uguale a 7,2.

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesio solfato eptaidrato):	22,50 g

Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua distillata.

$CaCl_2$ (calcio cloruro):	27,50 g

Scogliere e portare a 1 000 ml con acqua distillata.

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (ferro (III) cloruro esaidrato):	0,25 g

Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua distillata.

b) Terreno di coltura per la prova:

per ogni litro di acqua (1.6.1.1) aggiungere 1 ml di ciascuna delle soluzioni madre di cui sopra.

Il valore del pH deve essere uguale a 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Sostanze di riferimento.

Anilina (distillata prima dell'uso), acetato di sodio, benzoato di sodio.

1.6.2. *Apparecchiatura*

1.6.2.1. Bottiglie per BOD tarate, da 250—300 ml, con tappi di vetro, o bottiglie non tarate a collo stretto da 250 ml, con tappi di vetro, il cui volume deve essere determinato.

1.6.2.2. Varie bottiglie da 2, 3 e 5 litri, con segni a un litro, per la preparazione dell'esperimento e per il riempimento delle bottiglie BOD.

1.6.2.3. Pipette volumetriche da 1 a 10 ml. Imbuti e carta da filtro a grande porosità.

Bottiglie per la preparazione dell'inoculo.

1.6.2.4. Bagnomaria per mantenere le bottiglie a temperatura costante ed al riparo dalla luce.

1.6.3. *Preparazione dell'inoculo*

Per la preparazione dell'inoculo può essere impiegata ognuna delle seguenti 4 fonti; l'efficienza dell'inoculo deve essere controllata mediante una sostanza di riferimento (1.6.1.3).

1.6.3.1. Inoculo proveniente dal terreno

Sospensione acquosa di terreno di giardino non fertilizzato. In un litro di acqua del rubinetto, esente da cloro, disperdere una sospensione acquosa di 100 mg di terriccio di giardino non fertilizzato di recente (si presta particolarmente bene il terricio di una serra che rimanga per tutto l'anno a temperatura costante). Dopo 30 minuti, filtrare la sospensione su carta a grande porosità ed eliminare di primi 200 ml di filtrato. Per l'inoculazione (una goccia, lasciata cadere dalla punta di un pipetta, per un litro di volume finale), servirsi della parte principale del rimanente filtrato. L'inoculo va preparato immediatamente prima dell'esperimento; se destinato ad essere conservato per alcune ore; esso deve essere aerato. Il numero di batteri può essere determinato mediante conta su piastre o su dischi di terreno nutritivo. In un ml di volume finale non devono essere contenuti più di 10^3—10^5 germi.

1.6.3.2. Inoculo da un effluente secondario

L'inoculo deve essere preparato impiegando di preferenza un effluente di un impianto secondario (impianto a fanghi attivi o filtro percolatore destinati in prevalenza al trattamento delle acque reflue domestiche). Nel periodo compreso tra il campionamento e l'impiego, l'effluente deve essere mantenuto in condizioni aerobiche. Per preparare l'inoculo, filtrare il campione su carta a grande porosità. Eliminare i primi 200 ml e mantenere il resto del filtrato in condizioni aerobiche fino al momento dell'impiego. L'inoculo deve essere impiegato il giorno in cui viene raccolto.

1.6.3.3. Inoculo da un fango attivo di laboratorio

Si impiega l'effluente di un impianto a fango attivo di laboratorio, fortemente aerato. L'inoculo va preparato come descritto al punto 1.6.3.2.

1.6.3.4. Inoculo composto

Mescolare bene volumi uguali dei 3 campioni di inoculo (da 1.6.3.1 a 1.6.3.3) e ricavare l'inoculo finale da tale miscela.

1.6.4. *Modo di operare*

Tutte le operazioni necessarie prima dell'incubazione devono essere effettuate alla temperatura di 20 °C circa.

Preparare opportuni gruppi di bottiglie (1.6.2.1) per la determinazione del BOD della sostanza in esame e di quella di riferimento in serie sperimentali simultanee (vedi appendice 2). Se contemporaneamente vengono effettuate ulteriori analisi chimiche, preparare un numero sufficiente di bottiglie, comprendenti il controllo per l'inoculo ed il «bianco»: ad esempio, per le prove a 0, 5, 15 e 28 giorni su un solo prodotto, dopo aver preparato un sufficiente volume di acqua in bottiglie grandi (1.6.2.2), bisogna praparare 7 o 15 bottiglie in parallelo.

Le bottiglie grandi devono essere inanzitutto riempite per un terzo circa del loro volume con acqua distillata (1.6.1.1), mediante un sifone. Si pipettano poi nelle bottiglie stesse le singole soluzioni madre dei vari sali (1.6.1.2), tenendo presente il volume finale da raggiungere, e si aggiungono rispettivamente i prodotti di riferimento o da esaminare in quantità tale da raggiungere concentrazioni finali di 2 e in certi casi 5 o 10 mg/l.

La concentrazione di 9 ml circa di ossigeno disciolto per litro di acqua di diluizione a 20 °C limita le possibili concentrazioni di partenza del prodotto da esaminare a 2 mg/l circa, se si vuole assicurare la persistenza di una concentrazione significativa di ossigeno dopo l'ossidazione del substrato di prova.

Le sostanze scarsamente degradabili o con ThOD basso possono essere vantaggiosamente esaminate in parallelo a concentrazioni più elevate.

Si inocula con una goccia (lasciata cadere da una pipetta) per ogni litro di volume finale; analogamente si opera per il «bianco».

Per concludere, si porta a volume servendosi di un sifone che raggiunga il fondo della bottiglia (ciò assicura un sufficiente rimescolamento). Ciascuna soluzione viene quindi travasata nel rispettivo gruppo di bottiglie mediante un sifone immerso nel quarto inferiore della bottiglia (non fino al fondo).

Inoltre si analizzano o si conservano per successivi esami i controlli di zero (per l'ossigeno la determinazione deve essere effettuata per precipitazione con $MnCl_2$ e NaOH).

Le rimanenti bottiglie per le prove in parallelo sono poste in bagno d'acqua a 20 °C, mantenute al buio, e vengono tolte rispettivamente dopo 5, 15 e 28 giorni per essere analizzate.

Ciascuna serie deve essere accompagnata da una serie completa in parallelo per la determinazione del «bianco», della scomparsa dell'ossigeno senza inoculazione e della sostanza di controllo.

Prova di inibizione:

La verifica degli effetti inibitori delle sostanze nella prova in bottiglia chiusa è semplice ed agevole:

Serie 1: 2 mg/l di composto ben degradabile (ad esempio, alcool alifatico condensato con ossido di etilene, nel rapporto molecolare di 1/10, oppure uno qualunque dei composti di riferimento);

Serie 2: x mg/l del materiale da esaminare (di solito x = 2);

Serie 3: 2 mg/l del composto ben degradabile, più x mg/l del composto da esaminare.

Se il valore del BOD della serie 3 è inferiore alla somma di quelli delle serie 1 e 2, il materiale in esame puo essere considerato come dotato di azione inibitrice sui batteri alla concentrazione considerata. Questo esperimento di controllo è sempre necessario quando un risultato denotante una degradabilità scarsa o nulla appare illogico in considerazione della struttura del materiale in esame, se cioè si hanno ragioni per ritenere che esso sia provocato dall'inibizione.

1.6.5. *Determinazione dell'ossigeno disciolto*

La quantita di ossigeno disciolto deve essere determinata secondo un metodo chimico o elettrochimico riconosciuto sul piano nazionale e internazionale.

2. **DATI E VALUTAZIONI**

I risultati analitici devono essere registrati sulla scheda acclusa (vedi appendice 3). Il corso della prova di degradazione deve essere riportato come mostrato nell'allegato esempio (vedi appendice 4).

I risultati della prova di degradazione sono validi se sono state rispettate le seguenti condizioni:

— nell'intera serie di prove, il prodotto di riferimento deve aver mostrato una biodegradazione uguale o superiore al 60 % entro 28 giorni; in caso contrario l'intera serie deve essere scartata;

— il consumo dell'ossigeno della bottiglia senza inoculo non deve superare rispettivamente 0,3 mg/l di O_2 dopo 5 giorni e 0,4 mg/l di O_2 dopo 28 giorni; il «bianco» inoculato non deve superare 0,5 mg/l di O_2 dopo 5 giorni e 0,6 mg/l di O_2 dopo 15 e 28 giorni.

3. **RELAZIONE**

3.1. **Resoconto della prova**

Il resoconto deve comprendere, se possibile:

— i dati indicati secondo la scheda acclusa (vedi appendice 3);

— l'andamento del saggio di degradazione è rappresentato graficamente in un diagramma che mostra la fase latente, la fase di degradazione, la pendenza e il «*Time window*» («*Time window*» indica qui un periodo di 10 giorni, che inizia dal giorno in cui il livello osservato di biodegradazione supera per la prima volta il 10 %);

— i metodi impiegati per la determinazione del COD;

— i metodi impiegati per le misure dell'ossigeno;

— per le sostanze scarsamente solubili nelle condizioni di prova, il procedimento di dispersione;

— la convalida della prova.

3.2. **Interpretazione dei risultati**

Va presa in considerazione la possibilità che la presenza di composti contenenti azoto influisca sui risultati.

Dato il rigore della presente prova, un risultato caratterizzato da valori bassi non significa necessariamente che il composto in esame non è biodegradabile nelle condizioni ambientali, ma significa soltanto che occorre necessariamente più lavoro per stabilire tale caratteristica.

I prodotti chimici esaminati che nel corso di questa prova mostrano un elevato consumo di ossigeno devono essere considerati facilmente biodegradabili, purché tale livello sia raggiunto entro 10 giorni a partire dal momento in cui il livello di biodegradazione osservato supera per la prima volta il 10 %.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301 D. Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) Gerike P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determination with various chemicals in various tests, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159—173.

(3) Gerike P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determination with various chemicals in various tests, II. Additional results and conclusions, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45—55.

Appendice 1

Calcolo della richiesta biochimica teorica di ossigeno

Il ThOD del composto $C_cH_hCl_{cl}Na_{na}O_oN_nP_pS_s$, con peso molecolare PM, si calcola con la formula:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

Questo calcolo comporta che C sia mineralizzato a CO_2, H ad H_2O, P a P_2O_5 e Na a Na_2O. Gli alogeni vengono eliminati come acidi alogenidrici, e l'azoto come ammoniaca.

Esempio: Glucosio $C_6H_{12}O_6$, PM = 180.

$$ThOD = \frac{16\left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucosio}$$

I pesi molecolari dei sali diversi da quelli dei metalli alcalini vengono calcolati ammettendo che i sali siano idrolizzati.

Si presume che lo zolfo si trovi allo stato di ossidazione +6.

Esempio: Sodio n-alchilbenzensolfonato, $C_{18}H_{29}SO_3Na$, PM = 348.

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg di sostanza}$$

Nel caso dei composti contenenti azoto, questo può essere eliminato sotto forma di ammoniaca, nitrito o nitrato, a seconda delle varie richieste biochimiche teoriche di ossigeno.

$$ThOD_{NO_2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

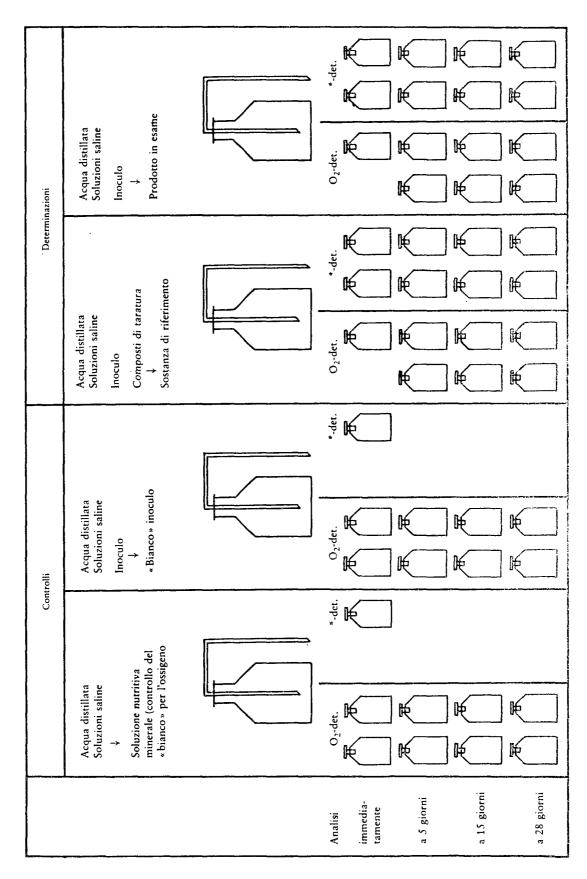
$$ThOD_{NO_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{MW}$$

Supponendo che, nel caso di una ammina secondaria, l'analisi abbia permesso di osservare una completa trasformazione in nitrati: $(C_{12}H_{25})_2$ NH; PM: 353.

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg di sostanza}$$

Schema della ripartizione delle bottiglie per il metodo della bottiglia chiusa

(* = *analisi specifiche eventuali*)

Appendice 3

Degradazione biotica: Metodo della bottiglia chiusa (Scheda)

Istituto che effettua la prova:

Direttore dello studio: . . . .

Data di inizio della prova: Numero dell'esperimento:

Prodotto esaminato:

Struttura chimica:

Analisi (metodo di Winkler od elettrodo di ossigeno):

ThOD o COD del materiale esaminato: . . . . mg O_2/mg di sostanza

Temperatura dell'acqua di diluizione dopo aerazione:

Concentrazione di O_2 nell'acqua dopo aerazione e riposo prima dell'inizio della prova: . . . mg/l di O_2

Inoculo:

Risultato della prova

D_t = BOD, espresso come ThOD % dopo 28 giorni

oppure

D_t = BOD, espresso come COD % dopo 28 giorni

Convalida dei risultati

Prodotto chimico di riferimento:

Risultato: . . . . BOD, espresso come ThOD % dopo 28 giorni

Esperimento di riferimento n.

Osservazioni

Istituto:

Materiale:

Esperimento n.

A: *Determinazioni di* O_2

	Bottiglia n.		mg O_2/l dopo x giorni			
			0	5	15	28
Soluzione minerale nutritiva senza materiale di prova e senza inoculo	Controllo O_2	c_1		—	—	—
		c_2		—	—	—
	Media	$m_0 = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Soluzione minerale nutritiva senza materiale di prova ma con inoculo	1	c_3				
	2	c_4				
	Media bianco	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Soluzione minerale nutritiva con materiale di prova e con inoculo	1	a_1				
	2	a_2				
	Media materiale	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

B: *Scomparsa* O_2 *(mg BOD/l) dopo x giorni*

$BOD_x - (m_0 - m_{t_x}) - (m_0 - m_{b_x})$ (*)

mg BOD/l dopo x giorni		
5	15	28

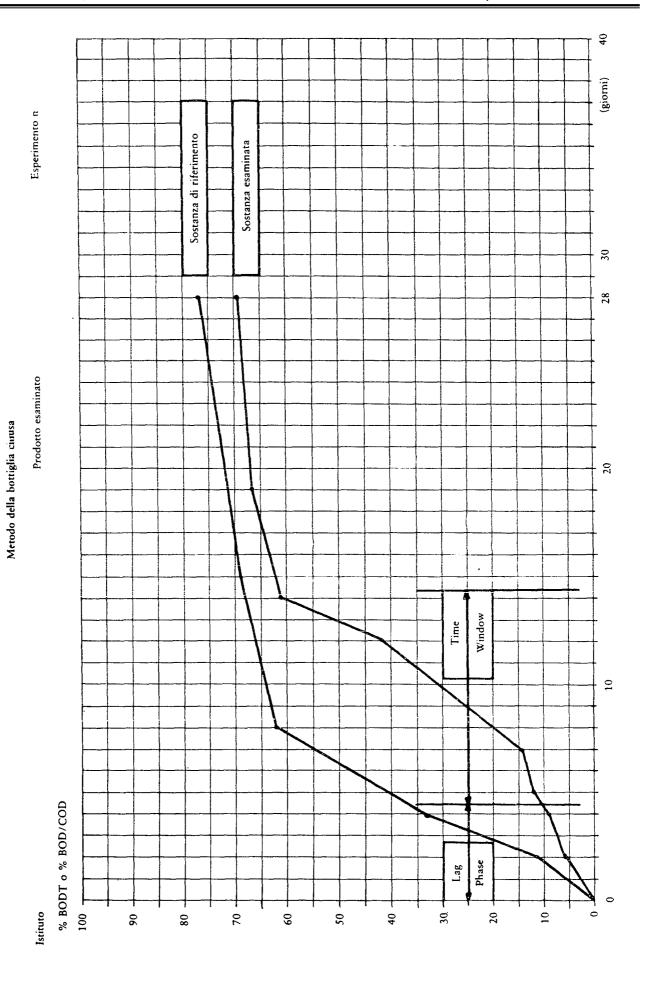
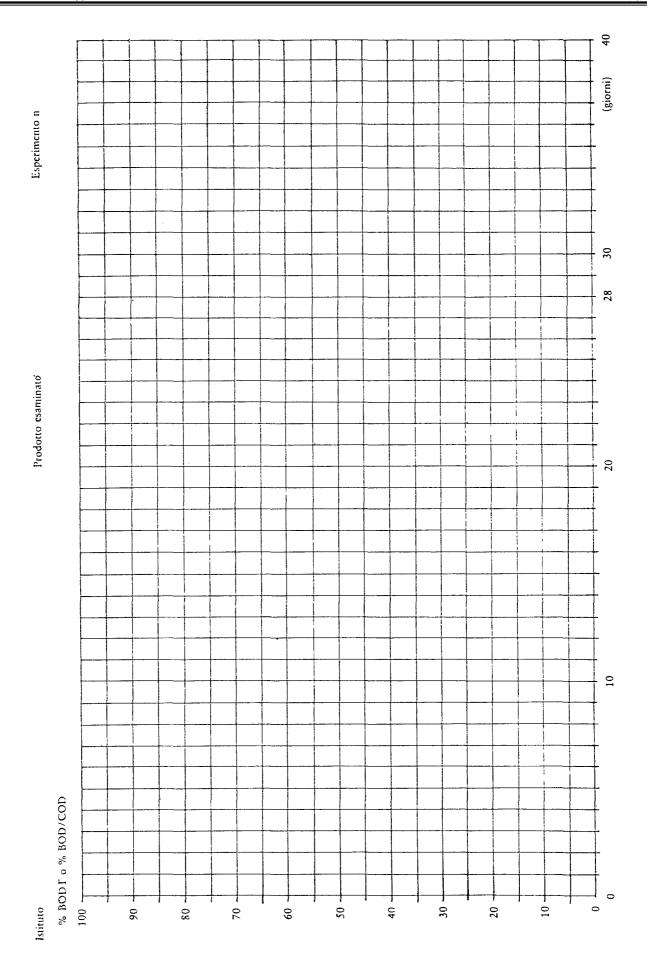
(*) Questa differenza è importante per controllare la validità della prova.

C: *Valutazione*

$D_t = \frac{mg\ BOD_x/l}{mg_{subs}/l \cdot ThOD} \cdot 100$ oppure $\%\ BOD_x/COD = \frac{mg\ BOD_x/l}{mg_{subs}/l \cdot COD} \cdot 100$

	dopo x giorni		
	5	15	28
% BOD/ThOD			
% BOD_x/COD			

Appendice 4
Metodo della bottiglia chiusa
Istituto
Prodotto esaminato
Esperimento n
% BODT o % BOD/COD
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
28
30
(giorni)
40
Sostanza di riferimento
Sostanza esaminata
Lag
Phase
Time
Window

Istituto
Prodotto esaminato
Esperimento n
% BOD T o % BOD/COD
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
28
30
40
(giorni)

C. 7. DEGRADAZIONE

DEGRADAZIONE BIOTICA: METODO MITI MODIFICATO

1. METODO

1.1. Introduzione

Il presente metodo è destinato a misurare la biodegradabilità delle sostanze organiche in ambiente acquoso mediante un'apparecchiatura respirometrica sulla quale possono essere lette direttamente le richieste biochimiche di ossigeno.

Per calcolare la richiesta teorica di ossigeno (ThOD) è necessario conoscere la formula empirica del materiale da esaminare, altrimenti si può utilizzare il metodo COD.

Il metodo può essere applicato esclusivamente all'esame delle sostanze organiche che, alla concentrazione impiegata per la prova:

— hanno una tensione di vapore trascurabile;

— non esercitano azione inibitrice sui batteri;

— non sono capaci di raggiungere il prodotto destinato ad assorbire la CO_2 e di reagire con esso.

Se il materiale in esame non è solubile alle concentrazioni sperimentali, per ottenere una buona dispersione della sostanza da esaminare si può ricorrere a metodi speciali, come l'impiego di ultrasuoni.

Per l'interpretazione dei valori bassi e per scegliere opportunamente le concentrazioni sperimentali, può essere utile disporre di dati sulla tossicità del composto chimico nei confronti dei microorganismi.

Per interpretare i risultati ottenuti e per scegliere opportunamente le concentrazioni sperimentali, sarà utile disporre di dati sulle proporzioni relative ai principali componenti della sostanza in esame.

1.2. Definizione ed espressione dei risultati

$$\text{Degradazione percentuale} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{ThOD (o COD)}} \times 100\ \%$$

ovvero:

$$\text{Degradazione percentuale} = \frac{\text{Sb} - \text{Sa}}{\text{Sb}} \times 100\ \%$$

dove:

BOD = richiesta biochimica di ossigeno, in mg, del composto in esame, misurata sulla curva del BOD;

B = consumo di ossigeno, in mg, del terreno di coltura addizionato all'inoculo, misurato sulla curva del BOD;

ThOD = quantità teorica di ossigeno, in mg, richiesta per la completa ossidazione del composto in esame;

Sa = quantità residua del composto in esame, in mg, dopo completamento della prova di biodegradabilità;

Sb = quantità residua del composto in esame, in mg, nella prova in bianco effettuata con acqua addizionata del solo composto in esame.

1.3. Sostanze di riferimento

Per controllare l'attività dell'inoculo, è opportuno fare uso di sostanze di riferimento. A questo fine possono essere impiegati anilina, acetato di sodio o benzoato di sodio. Se la percentuale di degradazione

dell'anilina, calcolata in base al consumo di ossigeno, non supera il 40 % dopo 7 giorni e il 65 % dopo 14 giorni, la prova non è considerata valida. La prova non è altresì considerata valida quando il tasso di recupero Sb risulta piuttosto basso.

1.4. **Principio del metodo**

Le sole fonti di carbonio organico sono i prodotti chimici da esaminare; tale metodo non prevede l'adattamento dei microorganismi ai prodotti stessi.

Per la misura si impiega un apparecchio automatizzato capace di misurare il consumo di ossigeno in un sistema chiuso (misuratore di BOD). I prodotti chimici da esaminare vengono introdotti nei recipienti di prova insieme ai microorganismi. Per tutta la durata dell'esperimento, la richiesta biochimica di ossigeno viene determinata continuamente attraverso il misuratore di BOD. Si procede al calcolo della biodegradabilità sulla base del BOD e si effettuano ulteriori analisi chimiche (concentrazioni del carbonio organico disciolto, dei residui di prodotti chimici, ecc.).

1.5. **Criteri di qualità**

1.5.1. *Riproducibilità:*

Generalmente buona, particolarmente per i prodotti con solubilità in acqua superiore a 0,1 g/l.

1.5.2. *Sensibilità:*

A) Consumo di ossigeno: limite di rivelazione = 1 mg (consumo di ossigeno da parte dei microorganismi).

B) Analisi chimica: dipende dalla sensibilità del metodo impiegato.

1.5.3. *Specificità*

Applicabile a qualsiasi tipo di prodotto chimico, per il quale il rapporto $(C)_{acqua}/(C)_{aria} \geq 1$. Per i prodotti chimici volatili, si deve impiegare un «misuratore di BOD modificato», costituito da appositi tubi capillari e da un normale misuratore di BOD (vedi appendice 1).

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. *Reattivi*

1.6.1.1. L'acqua distillata non deve contenere carbonio in quantità superiore al 10 % di quello introdotto con la sostanza da esaminare.

1.6.1.2. Terreno di coltura

Prelevare 3 ml di ognuna delle soluzioni A, B, C, D; aggiungere acqua fino a 1 000 ml (usare solamente acqua deionizzata):

A) K_2HPO_4 (potassio fosfato bibasico):	21,75 g
KH_2PO_4 (potassio fosfato monobasico):	8,50 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (sodio fosfato bibasico dodecaidrato):	44,60 g

NH_4Cl (ammonio cloruro):	1,70 g
Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1). Il pH deve essere di 7,2.	
B) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnesio solfato eptaidrato):	22,50 g
Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).	
C) $CaCl_2$ (calcio cloruro):	27,50 g
Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).	
D) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (ferro (III) cloruro esaidrato):	0,25 g
Sciogliere e portare a 1 000 ml con acqua (1.6.1.1).	

1.6.2. *Apparecchiatura*

Apparecchio per la misura del BOD provvisto di 6 bottiglie da 300 ml ciascuna.

Bottiglie 1 e 2:

300 ml di acqua deionizzata più 30 mg del prodotto chimico in esame.

Bottiglie 3 e 4:

300 ml del terreno di coltura, 9 mg (peso secco) di fango attivo, 30 mg del prodotto chimico in esame.

Bottiglia 5:

300 ml del terreno di coltura, 9 mg (peso secco) di fango attivo, 30 mg di anilina o altro prodotto di riferimento.

Bottiglia 6:

300 ml di terreno di coltura, 9 mg (peso secco) di fango attivo.

1.6.3. *Preparazione dell'inoculo*

1.6.3.1. Fango attivo

Punti di prelevamento del fango: in linea di massima, il prelevamento del fango va effettuato in non meno di 10 punti distribuiti in tutto il paese, principalmente nelle zone dove viene presumibilmente consumata e scaricata una grande varietà di prodotti chimici.

In Giappone, ad esempio, il fango attivo standard impiegato dal The Japanese Chemical Biotesting Center è costituito da una mescolanza di fanghi prelevati nei punti seguenti:

— impianti di trattamento di liquami di origine urbana: tre impianti, ubicati nel Giappone settentrionale, centrale e meridionale;

— scarichi industriali: un impianto destinato al trattamento delle acque reflue delle industrie chimiche;

— fiumi: tre fiumi, localizzati nel Giappone settentrionale, centrale e meridionale;

— laghi: un lago, ubicato nel Giappone centrale;

— mare: due mari interni del Giappone.

Frequenza di prelevamento dei fanghi: in linea di massima il prelievo deve essere effettuato 4 volte l'anno (marzo, giugno, settembre e dicembre).

Metodo di prelievo del fango:

— Scarichi urbani: 1 litro di campione prelevato dalla linea di ricircolo dei fanghi di un impianto di trattamento di liquami urbani.

— Fiumi, laghi e paludi o mare: 1 litro di acqua superficiale e 1 litro di terreno superficiale della riva, a contatto con l'atmosfera, relativamente a ciascun corpo idrico.

Preparazione:

I campioni dei fanghi raccolti sono mescolati per agitazione in un unico recipiente, e la miscela viene lasciata riposare. Si allontanano le sostanze estranee e galleggianti e si filtra il surnatante con carta da filtro n. 2. Il filtrato viene portato a pH 7,0 ± 1,0 con idrossido di sodio o con acido fosforico, poi viene trasferito in un recipiente di coltura ed aerato.

Coltura:

Dopo aver sospeso per 30 minuti circa l'aerazione della soluzione ottenuta al modo sopra indicato, si preleva $^1/_3$ circa dell'intero volume del surnatante. Al resto di tale liquido si aggiunge un uguale volume di liquame fognario sintetico (liquido fognario sintetico allo 0,1 % : sciogliere in acqua 1 g di glucosio, 1 g di peptone e 1 g di fosfato monopotassico; portare a pH 7,0 ± 1,0 con idrossido di sodio), poi si torna ad aerare la miscela. Il procedimento viene ripetuto una volta al giorno. L'incubazione viene effettuata a 25 ± 2 °C.

Controllo:

Per il controllo in fase di coltura, si controllano i punti seguenti e si effettuano le opportune regolazioni:

— aspetto del surnatante: il liquido che sovrasta il fango attivo deve essere limpido;

— comportamento del fango attivo: deve presentarsi in grandi flocculi e avere buone proprietà di sedimentazione;

— stato di formazione del fango attivo: nei casi in cui non si osserva lo sviluppo di flocculi si possono aumentare sia il volume che la frequenza di aggiunta del liquido fognario sintetico allo 0,1 %;

— pH del liquido superiore: 7,0 ± 1,0;

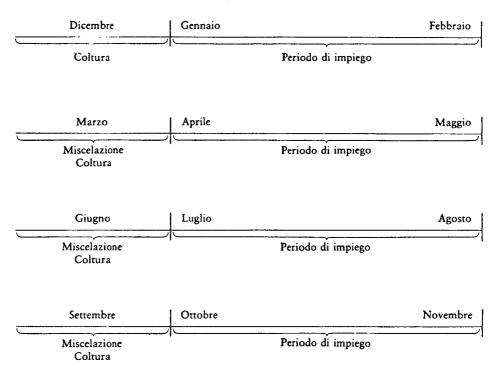
— temperatura: la temperatura di coltura del fango attivo deve essere di 25 ± 2 °C;

— aerazione: nel sostituire il surnatante con il liquido fognario sintetico, la sospensione nel recipiente di coltura deve essere aerata quanto basta a mantenere la concentrazione dell'ossigeno disciolto al di sopra di 5 mg/l;

— microflora del fango attivo: all'osservazione microscopica (x 100 ~ 400 ingrandimenti), insieme ai fiocchi di aspetto nebuloso, deve essere visibile un certo numero di protozoi di varie specie;

— miscelazione di fanghi attivi vecchi e nuovi: per mantenere i fanghi vecchi e nuovi allo stesso stato di attività, mescolare il filtrato del surnatante di un fango attivo impiegato nella prova con un uguale volume del filtrato del surnatante di un fango attivo di recente prelievo e mettere in coltura la miscela;

— controllo dell'attività del fango attivo: l'attività del fango attivo deve essere controllata periodicamente (almeno una volta ogni tre mesi) mediante sostanze di riferimento, applicando i metodi indicati più oltre. Particolarmente nel caso in cui vengano mescolati campioni di fanghi attivi vecchi e nuovi, il fango attivo vecchio deve essere accuratamente controllato.

Esempio di preparazione di campioni di fanghi attivi e periodi di impiego:

(Prosegue lo stesso schema di preparazione e di impiego.)

1.6.4. *Trattamento preliminare dei composti da esaminare*

Se il composto chimico da esaminare non è solubile in acqua fino alla concentrazione sperimentale, esso deve essere polverizzato quanto più finemente possibile.

1.6.5. *Aggiunta del composto da esaminare e preparazione per la prova*

Per la prova sono necessari i seguenti recipienti (vedi punto 1.6.2) che devono essere mantenuti alla temperatura di sperimentazione:

1) Due recipienti per saggio contenenti acqua alla quale sono aggiunti 100 mg/l del composto in esame (recipienti 1 e 2).

2) Due recipienti per saggio contenenti il mezzo di coltura di base, al quale sono aggunti 100 mg/l del composto in prova: il pH di questa soluzione è riportato a pH 7 prima dell'inoculazione del fango attivato, se necessario (recipienti 3 e 4).

3) Un recipiente per saggio contenente il mezzo di coltura di base al quale sono aggiunti 100 mg/l di anilina o di ogni altra sostanza di riferimento (recipiente 5).

4) Un recipiente per il saggio di controllo, contenente solo il mezzo di coltura di base (recipiente 6).

1.6.5.1. Inoculazione con il fango attivo

Nei recipienti 3, 4, 5 e 6 aggiungere fango attivo in quantità tale che la sostanza sospesa, definita ad esempio secondo le norme industriali giapponesi (3), sia presente alla concentrazione di 30 mg/l.

1.6.5.2. Condizioni sperimentali

Concentrazione dei prodotti chimici da esaminare: 100 mg/l.

Concentrazione del fango attivo: 30 mg/l.

Temperatura alla quale va effettuata la prova: 20—25 °C.

Durata dell'esperimento: 28 giorni.

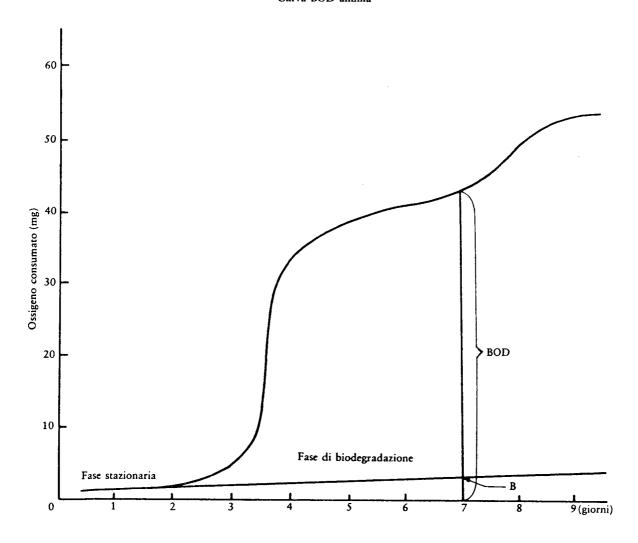
L'esperimento deve svolgersi al buio. Controllare ogni giorno la temperatura e il cambiamento di colore del contenuto del recipiente di coltura.

Agitare energicamente con un agitatore meccanico.

1.6.6. *Esecuzione della prova*

La variazione del BOD deve essere registrata sotto forma di linea continua per 28 giorni (vedi figura). Dopo i 28 giorni di prova, determinare i valori intermedi del pH, della concentrazione dei prodotti chimici residui e dei prodotti intermedi nei vari recipienti.

Figura

Curva BOD anilina

Analizzare anche il contenuto del recipiente non addizionato di fango attivo, per verificare se durante il periodo di prova i prodotti chimici in esame abbiano subito alterazioni chimiche o perdite per effetto dell'evaporazione, dell'assorbimento da parte delle pareti dei recipienti, ecc.

1.6.7. *Apparecchiatura analitica*

Se il composto in esame è solubile in acqua, alla fine della prova determinare la quantità residua di carbonio organico totale.

a) Se si impiega un apparecchio per l'analisi del carbonio organico totale:

prelevare 10 ml della soluzione in esame dal recipiente di prova, centrifugare a 3 000 g per 5 minuti e determinare la quantità residua di carbonio organico totale nel surnatante.

b) Se si impiegano altri apparecchi:

estrarre il contenuto totale di un recipiente con un solvente appropriato al composto sotto esame e, dopo oportuno trattamento preliminare (per esempio, concentrazione), determinare la quantità residua di composto in esame con oportuno strumento (gascromatografo, spettrometro di massa, spettrofotometro, ecc.).

Per i prodotti chimici volatili, il bagno termostatico del misuratore di BOD deve essere raffreddato a 10 °C, tale temperatura deve essere mantenuta per almeno 30 minuti, allo scopo di evitare l'evaporazione. Si passa poi al procedimento analitico a) o b).

2. DATI E VALUTAZIONI

2.1. Trattamento dei risultati

Il metodo per calcolare la degradazione percentuale in base al consumo di ossigeno e al risultato delle analisi dirette è definito al punto 1.2.

2.2. Valutazione dei risultati

La domanda teorica di ossigeno può essere calcolata come mostrato nell'appendice 2, oppure secondo il procedimento originale MITI:

Elemento	*Forma ossidata*
C	CO_2
H	H_2O
N	NO_2
S	SO_2
X (alogeno)	X

3. RELAZIONE

3.1. Resoconto della prova

Il resoconto della prova dovrebbe comprendere, se possibile, i punti seguenti:

— dati relativi ai prodotti chimici in esame (nome, formula di struttura, peso molecolare, grado di purezza, natura delle impurezze, proprietà chimico-fisiche, dati per l'identificazione);

— condizioni di lavoro;

— fango attivo: punti di campionamento e concentrazione dei fanghi;

— prodotto in esame: concentrazione;

— durata dell'esperimento;

— temperatura;

— procedimento analitico:

trattamento preliminare;

condizioni analitiche dello strumento;

% di recupero consentito dal metodo di analisi;

identificazione dei prodotti intermedi;

— risultati:

curve di biodegradazione (curva di controllo dell'attività dell'inoculo e curva relativa alla sostanza in esame)

BOD (mg)

B (mg)

Sa (mg)

Sb (mg)

ThOD (mg)

percentuale di degradazione attraverso il BOD;

percentuale di degradazione attraverso l'analisi chimica; cromatogrammi o spettri dei prodotti chimici sotto esame, ottenuti ed impiegati ai fini dell'analisi;

— prova di validità (vedi punto 1.3).

3.2. **Interpretazione dei risultati**

Va presa in considerazione la possibilità che la presenza di composti contenenti azoto influisca sui risultati.

Un tasso di recupero Sb dell'ordine del 10 % o meno è indizio di problemi analitici o anche di un idrolisi; in tal caso, i risultati devono essere interpretati con cautela.

Dato il rigore della presente prova, un valore basso non significa necessariamente che il composto in esame non e biodegradabile nelle condizioni ambientali, ma significa soltanto che occorre necessariamente ulteriore lavoro per stabilire tale caratteristica.

I prodotti chimici che nel corso di questa prova mostrano un elevato assorbimento di ossigeno, devono essere considerati come facilmente biodegradabili, purché tale livello sia raggiunto entro 10 giorni a partire dal momento in cui il livello di biodegradazione osservato supera per la prima volta il 10 %.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301C. Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances (C-5/98/JAP), 1978.

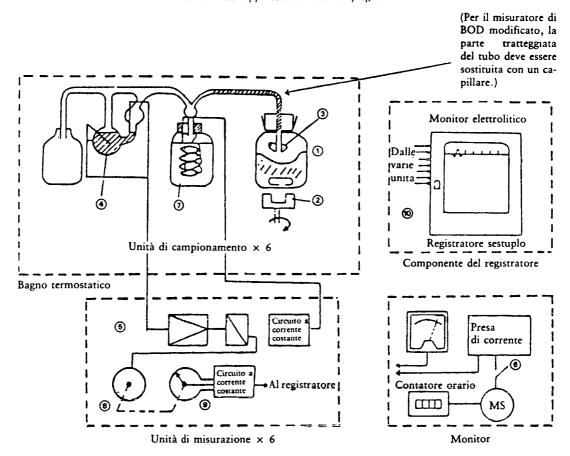
(3) The chemical substances control law in Japan (Chemical Products Safety Division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP), 1978.

(4) The biodegradability and bioaccumulation of new and existing chemical substances, 5, 8 (C-3/78/JAP), 1978.

Appendice 1

Principio dell'apparecchio di misura del consumo di ossigeno in un sistema chiuso

Il consumo di ossigeno da parte dei microorganismi può essere determinato con un metodo di analisi elettrochimica (voltametria).

Schema dell'apparecchiatura da impiegare

Il campione ottenuto nella bottiglia di coltura 1 viene mantenuto in agitazione mediante l'agitatore magnetico 2. Mano a mano che la reazione progredisce, l'ossigeno disciolto nel liquido viene consumato. L'ossigeno (O_2) contenuto nello spazio superiore della bottiglia di coltura passa in soluzione nel liquido, e al posto di esso si forma CO_2.

Quest'ultima viene assorbita dalla calce sodata (3). Di conseguenza, la pressione parziale dell'ossigeno e la pressione totale nello spazio superiore diminuiscono.

L'abbassamento di pressione viene rivelato e trasformato in segnale elettrico dal manometro ad elettrodo (4); detto segnale, amplificato dall'amplificatore (5), mette in funzione il relais (6), il quale aziona il motore sincrono (8). Simultaneamente, sotto l'effetto di una corrente costante, la soluzione di solfato di rame contenuta nella bottiglia elettrolitica (7) sviluppa ossigeno.

Tale ossigeno viene inviato alla bottiglia di coltura, e il recupero di pressione viene rivelato dal manometro, che stacca il relais e arresta l'elettrolisi e il motore sincrono.

Lo spazio superiore nella bottiglia di coltura viene così mantenuto sotto pressione costante di ossigeno, e si ha una proporzione fra la quantità di ossigeno consumata nella bottiglia di coltura e quella formatasi per elettrolisi, la quale è a sua volta proporzionale al tempo di elettrolisi sotto corrente costante. Mediante un potenziometro inserito nel circuito, l'angolo di rivoluzione del motore sincrono (9) è trasformato in un segnale in millivolt, dalla cui registrazione si può passare alla quantità di ossigeno consumato.

Appendice 2

Calcolo della richiesta teorica biochimica di ossigeno

La ThOD di una sostanza avente la formula $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ e il peso molecolare PM, si calcola con l'equazione:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

Tale calcolo implica che C sia mineralizzato a CO_2, H ad H_2O, P a P_2O_5 ed Na ad Na_2O. Gli alogeni sono eliminati come acidi alogenidrici e l'azoto come ammoniaca.

Esempio: Glucosio $C_6H_{12}O_6$, PM = 180.

$$ThOD = \frac{16\left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucosio.}$$

I pesi molecolari diversi da quelli di metalli alcalini si calcolano ammettendo che i sali siano stati idrolizzati. Si ammette inoltre che lo zolfo sia ossidato allo stato + 6.

Esempio: Sodio n-Alchilbenzensolfonato, $C_{18}H_{29}SO_3$ Na, PM = 348.

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \text{ mg } O_2/\text{mg di sostanza}$$

Nel caso delle sostanze contenenti azoto, quest'ultimo può essere elimenato sotto forma di ammoniaca, nitrito o nitrato, secondo le varie richieste biochimiche e teoriche di ossigeno.

$$ThOD_{NO_2^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

$$ThOD_{NO_3^-} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o\right]}{PM}$$

Supponendo che, nel caso di un'amina secondaria, l'analisi abbia permesso di osservare la formazione di soli nitrati:

$(C_{12}H_{25})_2NH$; PM = 353.

$$ThOD_{NO_3^-} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \text{ mg } O_2/\text{mg di sostanza}$$

Appendice 3

Degradazione biotica: Metodo MITI modificato (Scheda)

Istituto:

Direttore dello studio: . . . .

Data di inizio della prova: Numero dell'esperimento:

Prodotto esaminato: . . . .

Struttura chimica:

Procedura analitica: . . . .

ThOD o COD del prodotto esaminato:

Inoculo: . . . .

Luogo di prelevamento del campione: . . . .

Concentrazione:

Risultati dell'esperimento

. . . . % degradazione = $\frac{BOD - B}{ThOD} \times 100\ \%$ dopo 28 giorni

. . . . % degradazione = $\frac{BOD - B}{COD} \times 100\ \%$ dopo 28 giorni

. . . . % degradazione = $\frac{Sb - Sa}{Sb} \times 100\ \%$ dopo 28 giorni

Convalida dei risultati

Prodotto chimico di riferimento:

Risultato: . . . . % di degradazione dopo 28 giorni

Esperimento di riferimento n.

Osservazioni

Metodo MITI modificato
Istituto
Prodotto esaminato
Esperimento n
Biodegradazione
(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Sostanza di riferimento
Sostanza esaminata
Lag
Phase
Time
Window
0
10
20
28
30
(giorni)
40

Metodo MITI modificato

Istituto

Prodotto esaminato

Esperimento n

Biodegradazione

(%)

100

90

80

70

60

50

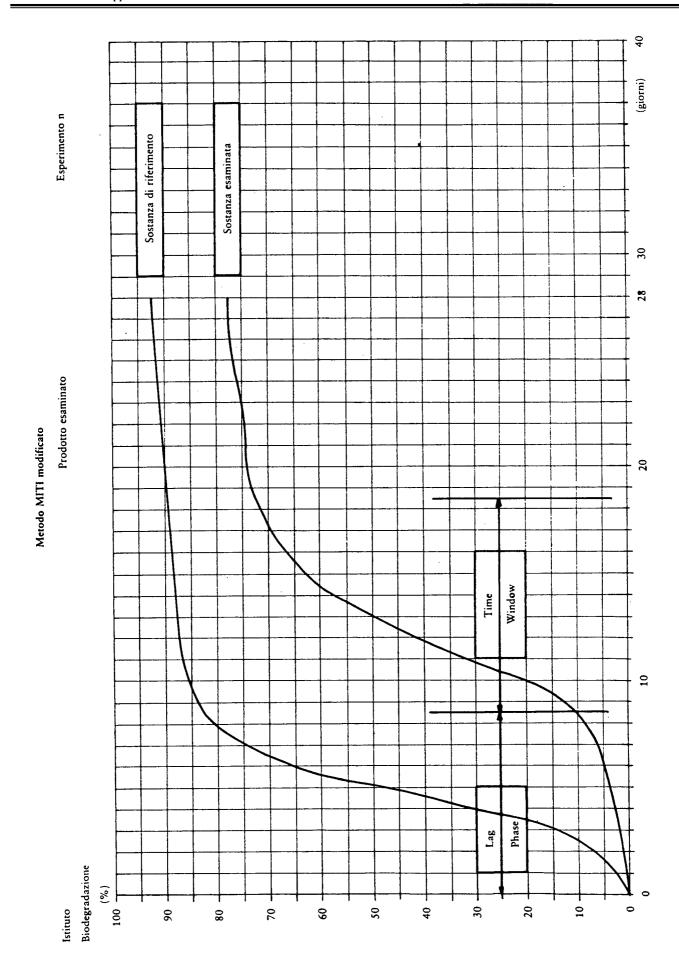
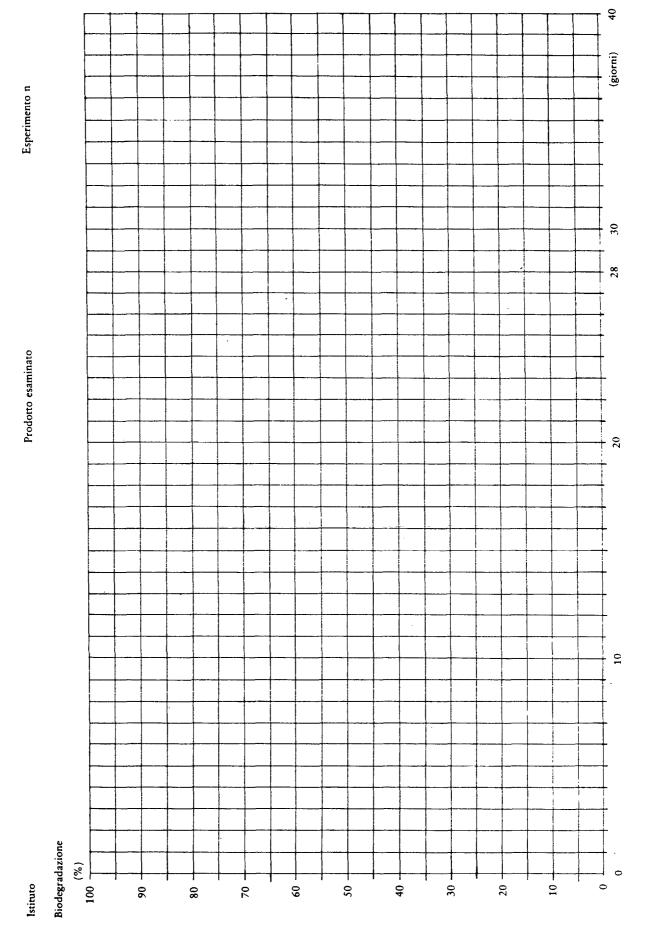
40

30

20

10

0

0 10 20 28 30 (giorni) 40

C. 8. DEGRADAZIONE

DOMANDA BIOCHIMICA DI OSSIGENO (BOD)

1. METODO

1.1. Introduzione

Il presente metodo serve a misurare la domanda biochimica di ossigeno (BOD) delle sostanze organiche solide e liquide.

I dati ottenuti con questa prova riguardano i composti idrosolubili; dovrebbe essere tuttavia possibile, almeno in linea di massima, esaminare anche i composti volatili e quelli poco solubili in acqua.

Il metodo può venire applicato soltanto a sostanze organiche che non esercitano azione inibitoria sui batteri alla concentrazione impiegata per le prove. Se la sostanza non è solubile, per ottenere una buona dispersione, potrà essere necessario ricorrere a misure speciali, come l'impiego di ultrasuoni.

Informazioni preliminari in merito alla tossicità del composto chimico possono risultare utili per interpretare i valori più bassi e per scegliere adeguate concentrazioni per la prova.

1.2. Definizioni ed espressione dei risultati

Si definisce BOD la quantità di ossigeno che un determinato quantitativo della sostanza in esame richiede, in determinate condizioni, per consentire il verificarsi del processo di ossidazione biochimica.

I risultati vengono espressi in g di BOD per g di sostanza esaminata.

1.3. Sostanze di riferimento

Non è attualmente possibile indicare sostanze per la taratura.

E consigliabile impiegare un adeguato prodotto chimico di controllo per verificare l'efficienza dell'inoculo.

1.4. *Principio del metodo*

Una quantità predeterminata della sostanza in esame, disciolta o dispersa in un mezzo idoneo ben aerato, viene inoculata con opportuni microorganismi e posta in incubazione al buio, a temperatura ambiente determinata e costante.

Il BOD viene determinato dalla differenza del contenuto di ossigeno disciolto all'inizio e alla fine del saggio. La durata del saggio deve essere almeno di 5 giorni e non più di 28 giorni.

Deve essere effettuata in parallelo una prova in bianco, su un sistema analogo, ma non contenente la sostanza in esame.

1.5. Criteri di qualità

La determinazione del BOD non può venire ritenuta una valida determinazione della biodegradabilità di una sostanza. Il presente metodo può essere considerato unicamente come un test orientativo.

1.6. Descrizione del metodo

Si prepara in precedenza una soluzione od una dispersione della sostanza da esaminare, per ottenere una concentrazione di BOD compatibile con il metodo impiegato. Si determina successivamente il BOD seguendo un qualunque metodo nazionale normalizzato. Sarebbe peraltro preferibile impiegarne uno internazionale, in merito al quale non si è però ancora raggiunto alcun accordo.

2. VALUTAZIONE DEI DATI

Il BOD contenuto nella soluzione preliminare viene calcolato conformemente al metodo normalizzato prescelto e convertito in grammi di BOD per grammi di sostanza esaminata.

3. RELAZIONE

Va precisato il metodo impiegato quanto le possibili variazioni.

La domanda biochimica di ossigeno deve risultare dalla media di almeno tre misurazioni valide.

Va indicata ogni informazione ed ogni osservazione utile per l'interpretazione della prova, in particolare per quanto riguarda impurità, stato fisico, effetti tossici, composizione intrinseca della sostanza ed ogni altro elemento tale da influenzarne i risultati.

Nella relazione va indicato l'eventuale impiego di un additivo mirante a impedire la nitrificazione biologica.

4. BIBLIOGRAFIA

Elenco di metodi normalizzati, quali ad esempio:

NF T 90—103	Determination of the Biochemical Oxygen Demand
NBN 407	Biochemical Oxygen Demand
NEN 3235 5.4	Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV)

The Determination of Biochemical Oxygen Demand, 1981, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

C. 9. DEGRADAZIONE

DOMANDA CHIMICA DI OSSIGENO (COD)

1. METODO

1.1. Introduzione

Il presente metodo è destinato alla misurazione della richiesta chimica di ossigeno (COD) delle sostanze organiche solide o liquide, secondo una tecnica normalizzata ed arbitraria, in condizioni di laboratorio prefissate.

Per effettuare la prova ed interpretarne i risultati sarà utile disporre di dati sulla composizione della sostanza (ad esempio: sali alogenati, sali ferrosi di composti organici, composti organoclorurati).

1.2. Definizioni ed espressione dei risultati

La richiesta chimica di ossigeno è una misura dell'ossidabilità di una sostanza, espressa come equivalente in ossigeno di un reattivo ossidante consumato dalla sostanza in condizioni di laboratorio prestabilite.

Il risultato si esprime in g COD/g sostanza in esame.

1.3. Sostanze di riferimento

Nell'esame di nuovi prodotti non è necessario impiegare costantemente sostanze di riferimento. Queste dovrebbero servire essenzialmente a calibrare saltuariamente il metodo e fornire la possibilità di confrontare i risultati con quelli ottenuti applicando un altro metodo.

1.4. Principio del metodo

Una quantità prestabilita della sostanza da esaminare, disciolta o dispersa in acqua, viene ossidata con potassio bicromato in ambiente fortemente acido per H_2SO_4, impiegando solfato d'argento come catalizzatore e facendo bollire a ricadere per due ore. La quantità residua di bicromato viene determinata titolando con solfato di ferro (II) e ammonio standardizzato.

Nel caso delle sostanze contenenti cloro, si aggiunge solfato di mercurio (II) per evitare l'interferenza dei cloruri.

1.5. Criteri di qualità

Data l'arbitrarietà del metodo di determinazione, il COD deve essere considerato piuttosto un «indicatore redox» che una misura della sostanza organica.

Nella prova possono interferire i cloruri; la determinazione del COD può inoltre essere alterata dalla presenza di riducenti od ossidanti inorganici.

Nelle condizioni descritte, alcuni composti ciclici non vengono ossidati completamente.

1.6. Descrizione del metodo

Si prepara una soluzione o una dispersione della sostanza in prova, in modo da ottenere una domanda chimica di ossigeno compresa tra 250 e 600 mg/l di COD.

Osservazione

Nel caso delle sostanze scarsamente solubili o non disperdibili, si può pesare una quantità di sostanza, finemente polverizzata od allo stato liquido, corrispondente a 5 mg di COD, e collocarla nell'apparecchio sperimentale con acqua.

Si determina poi il COD con qualsiasi metodo nazionale standardizzato in attesa della pubblicazione di un metodo standardizzato internazionale, che sarà da preferirsi.

2. DATI E VALUTAZIONI

Il COD del recipiente sperimentale viene calcolato secondo il metodo normalizzato prescelto e trasformato in grammi di COD per grammi della sostanza in esame.

3. RELAZIONE

Deve essere indicato il metodo di riferimento.

Il COD deve risultare dalla media di almeno tre misure. Devono essere riferiti tutti i dati e le osservazioni significativi per l'interpretazione dei valori ottenuti: ciò vale particolarmente per le impurezze, lo stato fisico e le proprietà della sostanza (se note), qualora possano influire sui risultati.

Va altresì riferito l'eventuale impiego di solfato mercurico per minimizzare l'interferenza dei cloruri.

4. BIBLIOGRAFIA

Elenco dei metodi standardizzati, ad esempio:

NBN T 91—201	Determination of the Chemical Oxygen Demand
ISBN 0 11 7512494	Chemical Oxygèn Demand (dichromate value) of polluted and waste waters
NF T 90—101	Determination of the Chemical Oxygen Demand
DS 217 — Water Analysis	Determination of the Chemical Oxygen Demand
DIN 38409 — H — 41	Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the range above 15 mg/l
NEN 3235 5.3	Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik
ISO DP 6060	Water quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate methods

C. 10. DEGRADAZIONE

DEGRADAZIONE ABIOTICA: IDROLISI IN FUNZIONE DEL pH

1. METODO

Il metodo descritto si basa sulla linea guida dell'OCSE (1).

1.1. Introduzione

Tra le reazioni che influenzano la persistenza delle sostanze nell'ambiente, l'idrolisi è importante ai fini della degradazione abiotica e riveste quindi particolare interesse per le sostanze caratterizzate da basse biodegradabilità.

La maggior parte delle reazioni di idrolisi è di *pseudo*-prim'ordine; i tempi di dimezzamento sono quindi indipendenti dalla concentrazione. Questo fatto consente di estrapolare i risultati ottenuti in laboratorio alle condizioni ambientali.

Sono stati inoltre riportati numerosi esempi (2) dai quali risulta un soddisfacente accordo tra risultati ottenuti in acqua pura ed in acqua naturale.

Ai fini dell'esecuzione del metodo, che è applicabile unicamente a sostanze solubili in acqua, è utile disporre di dati preliminari relativi alla tensione di vapore della sostanza in esame. Eventuali impurezze influenzeranno in genere i risultati.

È necessario esaminare il comportamento idrolitico ai valori di pH normalmente riscontrabili nell'ambiente (pH 4—9).

1.2. Definizione ed unità di misura

Per idrolisi s'intende la reazione di un composto chimico RX con l'acqua, che può venir rappresentata dallo scambio del gruppo X con OH:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad (1)$$

La velocità con cui la concentrazione di RX diminuisce è data da:

$$\text{Velocità} = k \cdot [H_2O] \cdot [RX] \qquad (2)$$

Poiché l'acqua è presente in grande eccesso rispetto alla sostanza RX, la relazione [2] è normalmente descritta come «reazione di *pseudo*-prim'ordine»; la relativa costante di velocità osservata è espressa dalla relazione:

$$k_{oss} = k \cdot [H_2O] \qquad (3)$$

e puo essere ricavata, per un dato valore di pH e della temperatura, T, dall'espressione:

$$k_{oss} = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{C_0}{C_t} \qquad (4)$$

dove:

t = tempo,
C_0 = concentrazione di RX al tempo 0,
C_t = concentrazione di RX al tempo t,
2,303 = fattore di conversione tra logaritmi naturali e decimali.

Le concentrazioni sono espresse in g/l o moli/l.

La dimensione della costante k_{oss} è $(tempo)^{-1}$

Il «tempo di dimezzamento», $t_{1/2}$, è definito come il tempo necessario affinché la concentrazione di RX sia ridotta del 50 %, cioè affinché

$$c_t = {}^1/_2 \cdot C_0 \qquad (5)$$

Dalle espressioni [4] e [5] deriva che

$$t_{1/2} = 0{,}693/k_{oss} \qquad (6)$$

1.3. **Sostanze di riferimento**

Quando si esamini una nuova sostanza, non è sempre necessario fare uso di sostanze di riferimento, che andrebbero soprattutto utilizzate per controllare saltuariamente il funzionamento del metodo e per rendere possibile il confronto con risultati ottenuti impiegando un altro metodo. L'acido acetilsalicilico (aspirina) e l'O, O-dietil-O-(6-metil-2-(1-metiletil)-4-pirimidinil) fosforotionato (diazinone), sono stati usati come sostanze di riferimento (1).

1.4. **Principio del metodo**

Si prepara una soluzione diluita della sostanza in acqua, si controllano pH e temperatura.

La diminuzione della concentrazione della sostanza in funzione del tempo viene seguita mediante una adeguata metodologia analitica.

I valori del logaritmo delle concentrazioni vengono riportati in un grafico in funzione del tempo; qualora si ottenga una linea retta, la costante di idrolisi viene calcolata dalla pendenza della retta (vedi paragrafo 2).

Può verificarsi il caso in cui la costante di velocità non sia, in pratica, misurabile direttamente ad una particolare temperatura; in tal caso la costante può essere ricavata indirettamente applicando la relazione di Arrhenius che esprime la dipendenza delle costanti di velocità dalla temperatura. La costante non direttamente misurabile puo cioè essere ottenuta per estrapolazione, utilizzando la retta che esprime la variazione del logaritmo della costante di velocità, misurata ad opportune temperature, in funzione dell'inverso della temperatura assoluta (K).

1.5. **Criteri di qualità**

Dal riferimento bibliografico (2) risulta che misure di costanti di velocità di idrolisi, quali quelle eseguite su 13 classi di strutture organiche, possono raggiungere una elevata precisione.

La ripetibilità dipende in particolare dal controllo del pH e della concentrazione dell'ossigeno disciolto; può anche essere influenzata dalla presensa di microorganismi.

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. *Reagenti*

1.6.1.1. Soluzioni tampone

La sperimentazione deve essere eseguita ai valori di pH: 4,0, 7,0 e 9,0.

A tale scopo si devono preparare soluzioni tampone impiegando prodotti di purezza analitica ed acqua distillata o deionizzata e sterile. Nell'appendice sono presentati alcuni esempi di sistemi tampone.

E opportuno osservare che il sistema tampone impiegato può influenzare la velocità d'idrolisi; in tal caso, si utilizzerà un altro sistema tampone. Nel riferimento bibliografico (2) si consiglia l'uso di tamponi borato e acetato anziché fosfato.

Qualora il pH di una soluzione tampone alla temperatura di sperimentazione non sia noto, esso deve essere determinato, alla temperatura prescelta, con precisione pari a ± 0,1 unità di pH mediante un pH-metro tarato.

1.6.1.2. Soluzioni in esame

La sostanza in esame va disciolta nella soluzione tampone.

La sua concentrazione non dovrebbe essere maggiore di 0,01 M o della metà della concentrazione di saturazione (la concentrazione da utilizzare è, tra le due, quella che risulta più bassa).

L'uso di solventi organici miscibili con l'acqua è raccomandato solamente nel caso di sostanze di bassa solubilità. La quantità del co-solvente dovrebbe essere minore dell'1 %, e tale da non interferire con il processo idrolitico.

1.6.2. *Apparecchiature*

Si dovrebbero utilizzare recipienti di vetro muniti di tappo evitando comunque l'uso di grasso negli smerigli.

Qualora il composto chimico o il sistema tampone siano volatili, ovvero qualora la sperimentazione sia effettuata a temperature elevate, saranno da preferirsi contenitori saldati o provvisti di chiusura a tenuta e sara da evitare la presenza di spazio di testa.

1.6.3. *Metodo analitico*

Il metodo analitico da utilizzare dipenderà dalla natura della sostanza da esaminare; esso deve essere sufficientemente preciso e sensibile in modo da rivelare una riduzione della concentrazione iniziale della sostanza pari al 10 %; deve inoltre essere specifico per la sostanza in esame nella soluzione in esame. Il metodo potrà senz'altro consistere di una combinazione di tecniche analitiche adeguate.

1.6.4. *Condizioni sperimentali*

Il test sarà eseguito utilizzando un ambiente termostatato regolato alla temperatura prescelta per la reazione, ± 0,5 °C. La temperatura dovrà essere mantenuta costante entro ± 0,1 °C e misurata con precisione pari a ± 0,1 °C.

Si dovranno adottare misure adeguate per evitare effetti fotolitici ed anche per escludere la presenza di ossigeno disciolto (a tal fine si può far gorgogliare azoto oppure argon nel solvente prima di preparare la soluzione d'esame).

1.6.5. *Procedimento sperimentale*

1.6.5.1. Saggio preliminare

Per tutte le sostanze si deve effettuare un saggio preliminare a 50 °C ± 0,5 °C e ai tre valori di pH: 4,0, 7,0 e 9,0. A tal fine un numero sufficiente di misure deve essere fatto in modo che si possa valutare se, a ciascun valore di pH e a 50 °C, il tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$) sia minore di 2,4 ore, oppure se la quantita di sostanza idrolizzata dopo 5 giorni sia meno del 10 %. [Si può ritenere che questi valori corrispondano rispettivamente a temi di dimezzamento minori di 1 giorno e maggiori di 1 anno in condizioni ambientali (25 °C).]

Se il test preliminare indica che il 50 % della sostanza (o più del 50 %) è idrolizzato in 2,4 ore a 50 °C, oppure che meno del 10 % è idrolizzato dopo 5 giorni a ciascuno dei valori di pH (4, 7 e 9) nessun altro saggio deve essere eseguito.

Diversamente, e per quei valori di pH in cui non si verifica questa condizione, si esegue il test n. 1.

1.6.5.2. Test n. 1

Il test n. 1 viene eseguito ad una temperatura, preferibilmente a 50 ± 0,5 °C in condizioni sterili se la sostanza è biodegradabile, a quei valori di pH in cui il saggio preliminare ha mostrato la necessità di ulteriore sperimentazione.

Un numero sufficiente, non inferiore a 4, di campioni deve essere prelevato dopo tempi di reazione tali che la quantità di sostanza idrolizzata sia compresa nell'intervallo da 20 a 70 %; ciò al fine di verificare se la reazione ai valori di pH in esame sia di *pseudo*-prim'ordine.

Per ciascun pH si determina l'ordine di reazione.

Valutazione della costante di velocità a 25 °C:

La decisione su come procedere sperimentalmente dipende dall'ordine di reazione determinato mediante il test n. 1: la reazione può essere di *pseudo*-prim'ordine, oppure no.

Se non è possibile concludere con certezza che la reazione è di prim'ordine, si prosegue la sperimentazione secondo quanto descritto nel test n. 2.

Se invece si può senza incertezze concludere, in base al test n. 1, che la reazione è di *pseudo*-prim ordine, si prosegue la sperimentazione come descritto nel test n. 3. [Alternativamente, in particolari circostanze, potrebbe essere possibile calcolare la costante di velocità a 25 °C in base al valore della costante a 50 °C ottenuta mediante i risultati del test n. 1 (vedi paragrafo 3.2).]

1.6.5.3. Test n. 2

Questo saggio viene eseguito a ciascuno dei valori di pH indicati dai risultati del test n. 1

— o ad una temperatura minore di 40 °C,

— oppure a due temperature maggiori di 60 °C e che differiscano tra di loro di almeno 10 °C.

Per ciascun valore di pH e di temperatura in cui si esegue il test n. 2 si dovranno prelevare almeno 6 campioni della soluzione tali che si possa disporre di 6 valori di concentrazione opportunamente distanziati e relativi a stati di avanzamento dell'idrolisi compresi tra il 20 e il 70 %.

Per un valore di pH ed una temperatura, si dovrà effettuare una determinazione in doppio. Qualora, il test n. 2 sia fatto a due temperature, la determinazione in doppio dovrà essere fatta per la minore delle due.

Per ciascun valore di pH e della temperatura in cui è stato eseguito il test n. 2, sarà data, se possibile, una valutazione grafica del tempo di dimezzamento.

1.6.5.4. Test n. 3

Questo saggio viene eseguito a ciascuno dei valori di pH indicati dai risultati del test n. 1

— o ad una temperatura minore di 40 °C,

— oppure a due temperature maggiori di 50 °C e che differiscano tra loro di almeno 10 °C.

Per ciascun valore di pH e di temperatura in cui si esegue il test n. 3 si dovranno prelevare 3 campioni: il primo relativo al tempo 0 e il secondo e il terzo dopo tempi di reazione tali che lo stato di avanzamento dell'idrolisi supera il 30 %. Si calcolano infine, se è possibile, la costante k_{oss} e il tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$).

2. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Per le reazioni di *pseudo*-prim'ordine, i valori di k_{oss} per ciascun valore di pH e della temperatura possono essere ottenuti dal grafico del logaritmo della concentrazione in funzione del tempo usando l'espressione:

$$k_{oss} = - \text{pendenza} \times 2{,}303$$

Il tempo di dimezzamento può essere calcolato usando l'equazione (6).

La costante di velocità a 25 °C, $k_{25\,°C}$, può essere calcolata, ove necessario, mediante l'equazione di Arrhenius.

Per le reazioni che non sono di *pseudo*-prim'ordine vedi paragrafo 3.1.

3. RELAZIONE

3.1. Informazioni da riportare

La relazione dovrà contenere, se possibile, le seguenti informazioni:

— descrizione precisa della sostanza,

— ogni risultato, ottenuto con sostanze di riferimento,

— descrizione del principo e dei dettagli del metodo analitico usato,

— per ogni saggio: la temperatura, il pH e la composizione del tampone ed una tabella delle coppie di valori concentrazione-tempo,

— per le reazioni di *pseudo*-prim'ordine: i valori di k_{oss} $t_{1/2}$ e la procedura di calcolo,

— per le reazione non di *pseudo*-prim'ordine: i grafici dei risultati sotto forma di logaritmo della concentrazione verso il tempo,

— tutte le informazioni od osservazioni necessarie per la valutazione dei risultati.

3.2. Valutazione dei risultati

Può essere possibile calcolare un valore accettabile della costante di velocità (a 25 °C) della sostanza in esame in base al valore ottenuto a 50 °C, ammesso che già esistano valori sperimentali dell'energia di attivazione per sostanze omologhe alla sostanza in esame e ammesso che sia ragionevole assumere che l'energia di attivazione della sostanza in esame sia dello stesso ordine di grandezza delle energie d'attivazione sperimentali prese come riferimento.

4. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111. Decision of the Council C(81) 30 Final.
(2) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111 ref. (2). Decision of the Council C(81) 30 Final.

Appendice

MISCELE TAMPONE

A. CLARK E LUBS

I valori del pH riportati in queste tabelle sono stati calcolati da misure di potenziale utilizzando le equazioni standard di Sörensen (1909). I valori effettivi del pH sono maggiori di 0,04 unità rispetto a quelli delle tabelle.

Composizione

	pH
0,1 M Ftalato acido di potassio + 0,1 N HCl a 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato a 100 ml	3,8
0,1 M Ftalato acido di potassio + 0,1 N NaOH a 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato a 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato a 100 ml	4,2
0,1 M Fosfato monopotassico + 0,1 N NaOH a 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,2
0,1 M H_3BO_3 in 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH a 20 °C	
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF E VLEESCHOUWER

Composizione

	pH
Citrato monopotassico 0,1 M e NaOH 0,1 N a 18 °C (aggiungere qualche cristallino di timolo o pochi mg di mercurio per prevenire la formazione di muffa)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,2

C. SORENSEN

Borace 0,05 M + HCl 0,1 N

Composizione		pH			
ml Borace	ml HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86

Borace 0,05 M + NaOH 0,1 N

Composizione		pH			
ml Borace	ml NaOH	Sorensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
9,00	1,00	9,36	9,42	9,18	8,94
8,00	2,00	9,50	9,57	9,30	9,02
7,00	3,00	9,68	9,76	9,44	9,12

(7502)

ERNESTO LUPO, *direttore*

DINO EGIDIO MARTINA, *reda*
FRANCESCO NOCITA, *vice reda*

(6651235/5) - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - S.